



Universidade de Santiago de Compostela
Facultade de Medicina e Odontoloxía
Departamento de Fisioloxía

REGULACIÓN E FUNCIÓN DE SOX2 EN CANCRO E AVELLEMENTAMENTO

Memoria do traballo de investigación para optar ao grao de Doutora

Realizado por:

Jéssica María Vilas Martínez

Fdo.: Jéssica María Vilas Martínez

Santiago de Compostela, 2017

O Dr. **Manuel Collado Rodríguez**, investigador do programa Miguel Servet no Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), e o Dr. **Anxo Vidal Figueroa**, profesor contratado doutor do Departamento de Fisioloxía da Universidade de Santiago de Compostela (USC).

CERTIFICAN

Que o traballo titulado “**Regulación e función de Sox2 en cancro e avellentamento**”, presentado por **Jéssica María Vilas Martínez** para optar ao grao de Doutora pola Universidade de Santiago de Compostela, foi realizado baixo a súa dirección no Departamento de Fisioloxía da Universidade de Santiago de Compostela e, considerando que cumpre as condicións necesarias, considéranos finalizado e autorizan a súa presentación a fin de que poida ser defendido ante o tribunal correspondente.

En Santiago de Compostela, maio do 2017.

Fdo.: Dr. Manuel Collado Rodríguez

Director de tese

Fdo.: Dr. Anxo Vidal Figueroa

Director de tese e titor

Fdo.: Jéssica María Vilas Martínez

Que nada nos defina. Que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância.

Simone de Beauvoir



Aos meus pais e irmán.



Unha vez finalizada a tese sempre fica o capítulo máis complicado de escribir, o dos agradecementos. Este camiño estivo ateigado de coñecemento, aprendizaxe e compañeirismo, polo que só me resta amosar a miña gratitude a todas esas persoas que me acompañastes ao longo destes anos.

Aos meus directores de tese, Manuel Collado e Anxo Vidal, por darme a oportunidade de realizar este traballo baixo a súa dirección. A Carmen Carneiro e Carmen Rivas pola súa dispoñibilidade incondicional.

Ás miñas compañeiras de laboratorio nos inicios desta andaina, Alba Ferreirós, Sabela Da Silva e Pilar Alvariño, por facer do noso lugar de traballo unha atmosfera perfecta para levar a cabo os nosos experimentos e por aledarme o día a día. A tod@s @s compañeir@s que foron pasando durante estes anos polo noso laboratorio e que deixaron pegada, Maite Baz, Francisco Javier Aguado, Jeannette Martínez, Luís Machado, Adela Vázquez, Lucía Martínez, Mariña Fontenla, Inés Martínez, Nerea Troáns, María Gómez, Sonia Zumalave, etc.. E por último, a Pablo Pedrosa e a Francisco Triana, as nosas dúas últimas incorporacións, por estar presentes nesta etapa.

A tod@s @s compañeir@s do IDIS e en especial a Carmen Abuín, Marta Alonso, Abi Judit Vázquez, Andrea González e Ángel Fernández pola súa axuda e as vivencias compartidas.

Aos meus amigos e as miñas amigas de toda a vida, Ana, David, Esteban, Nely, Nistal e Patricia, polo seu inmenso cariño, polos seus reiterados ánimos e por comprender as miñas ausencias.

Ás miñas amigas de aventuras e viaxes do mundo da Bioloxía, Alicia, Andrea e Mónica, que a pesares da distancia, sempre recibo os seus aloumiños.

Ás miñas compañeiras de batalla constante, Alicias e Saras en plural, Aida, Ana, Ángela, Carmen, Cris, Helena, María, Marta e ás que fican por chegar, pola súa sororidade.

A todas esas persoas que me fun atopando polo sendeiro da vida, principalmente a Alba G., Natalia, Paco, Damián e o pequeno Breixo.

A Julia Marín e Manuel Iglesia pola súa contribución ao deseño da portada e á maquetación deste traballo.

E por último, pero non menos importante, á miña familia. En especial, aos meus pais e irmán, polo apoio e cariño recibido. Obrigada por estardes sempre aí.

Nos últimos anos, o estudo da bioloxía das células nai estendeuse máis aló da área da bioloxía do desenvolvemento para abarcar tamén o estudo de moitos outros procesos nos que estas células, ou as súas vías de sinalización, xogan un papel determinante. Deste xeito por exemplo, diversos estudos demostraron que as células nai xogan un papel importante nos procesos biolóxicos do cancro e do envellecemento.

De entre os factores clave no mantemento da pluripotencia das células nai embrionarias e na indución de pluripotencia en células adultas, o factor de transcrición Sox2 demostrou ter unha gran relevancia non só durante o desenvolvemento embrionario senón tamén na homeostase e rexeneración tisular nalgúns tecidos adultos (cerebro, retina, hipófise, etc.) como se suxire pola súa expresión en poboacións de células nai e proxenitoras. Ademais disto, sábese que Sox2 está asociado con numerosos tipos de cancro, mesmo sendo descrito como oncoxene en carcinoma de célula escamosa de esófago e pulmón. Por todo isto, o obxectivo do noso traballo foi estudar a regulación transcricional e a función de Sox2 en cancro e envellecemento.

Os nosos resultados mostran que os membros da familia de supresores tumorais retinoblastoma contribúen á represión transcricional de Sox2. En concreto, observouse que a eliminación de Rb e p130 conduce a unha represión defectuosa de Sox2, unha desrepresión que se amplifica pola inactivación de p53. Usando a reprogramación celular, testamos o impacto da represión defectuosa de Sox2 e confirmamos que a deficiencia de Rb permite a xeración de iPSCs en ausencia de Sox2 exógeno. Ademais, a eliminación parcial das células Sox2 positivas reduciu o desenvolvemento de tumores hipofisarios iniciados pola perda de Rb *in vivo*.

Así mesmo, tamén observamos que p53 reprime a expresión de Sox2 en varias liñas celulares tumorais e que un incremento dos niveis de Sox2 nalgúns destas liñas reduce a proliferación celular e a capacidade de formación de colonias, á vez que promove o proceso de EMT e a migración celular.

Por último, con respecto ao papel das células Sox2 positivas no proceso de envellecemento, mostramos que a eliminación reiterada destas células en rato provoca a aparición dun fenotipo de envellecemento prematuro, o que apoia a hipótese que expón que durante o envellecemento prodúcese un esgotamento nas poboacións de células nai e proxenitoras.

Os resultados desta tese, en definitiva, achegan máis datos que supoñen un apoio á relevancia do estudo das células nai e a súa bioloxía en cancro e envellecemento.

En los últimos años, el estudio de la biología de las células madre se extendió más allá del área de la biología del desarrollo para abarcar también el estudio de muchos otros procesos en los que estas células, o sus vías de señalización, juegan un papel determinante. De esta manera por ejemplo, diversos estudios han demostrado que las células madre juegan un papel importante en los procesos biológicos del cáncer y del envejecimiento.

De entre los factores clave en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre embrionarias y en la inducción de pluripotencia en células adultas, el factor de transcripción Sox2 demostró tener una gran relevancia no solo durante el desarrollo embrionario sino también en la homeostasis y regeneración tisular en algunos tejidos adultos (cerebro, retina, hipófisis, etc.) como se sugiere por su expresión en poblaciones de células madre y progenitoras. Además, se sabe que Sox2 está asociado con numerosos tipos de cáncer, mismo siendo descrito como oncogén en carcinoma de célula escamosa de esófago y pulmón. Por todo esto, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la regulación transcripcional y la función de Sox2 en cáncer y envejecimiento.

Nuestros resultados han mostrado que los miembros de la familia de supresores tumorales retinoblastoma contribuyen a la represión transcripcional de Sox2. En concreto, se observó que la eliminación de Rb e p130 conduce a una represión defectuosa de Sox2, una desrepresión que se amplifica por la inactivación de p53. Usando la reprogramación celular, testamos el impacto de la represión defectuosa de Sox2 y confirmamos que la deficiencia de Rb permite la generación de iPSCs en ausencia de Sox2 exógeno. Además, la eliminación parcial de las células Sox2 positivas redujo el desarrollo de tumores hipofisarios iniciados por la pérdida de Rb *in vivo*.

Así mismo, también observamos que p53 reprime la expresión de Sox2 en varias líneas celulares tumorales y que un incremento de los niveles de Sox2 en algunas de estas líneas reduce la proliferación celular y la capacidad de formación de colonias, a la vez que promueve el proceso de EMT y la migración celular.

Por último, con respecto al papel de las células Sox2 positivas en el proceso de envejecimiento, mostramos que la eliminación reiterada de estas células en ratón provoca la aparición de un fenotipo de envejecimiento prematuro, lo que apoya la hipótesis que expone que durante el envejecimiento se produce un agotamiento en las poblaciones de células madre y progenitoras.

Los resultados de esta tesis, en definitiva, aportan más datos que suponen un apoyo a la relevancia del estudio de las células madre y su biología en cáncer y envejecimiento.

In the last years, the study of stem cell biology has been extended beyond the area of developmental biology to encompass also the study of many other processes in which these cells, or their signaling pathways, play a determining role. In this way for example, several studies have shown that stem cells play an important role in the biological processes of cancer and aging.

Among the key factors in the maintenance of the pluripotency of embryonic stem cells and the induction of pluripotency in adult cells, the transcription factor Sox2 proved to have a great relevance not only during the embryonic development but also in the homeostasis and tissue regeneration in some adult tissues (brain, retina, pituitary, etc.) as suggested by its expression in stem and progenitor populations. In addition, Sox2 is known to be associated with numerous types of cancer, having been even described as an oncogene in squamous cell carcinoma of the esophagus and lung. For all this, the aim of our work was to study transcriptional regulation and Sox2 function in cancer and aging.

Our results have shown that members of the retinoblastoma tumor suppressor family contribute to the transcriptional repression of Sox2. In particular, it was observed that removal of Rb and p130 leads to defective suppression of Sox2, a derepression that is amplified by the inactivation of p53. Using cellular reprogramming, we tested the impact of defective suppression of Sox2 and confirmed that Rb deficiency allows the generation of iPSCs in the absence of exogenous Sox2. In addition, partial removal of Sox2 positive cells reduced the development of pituitary tumors initiated by the loss of Rb *in vivo*.

Likewise, we also observed that p53 represses Sox2 expression in several tumor cell lines and that an increase in Sox2 levels in some of these lines reduces cell proliferation and colony formation capacity, while promoting the process of EMT and cell migration.

Finally, with respect to the role of Sox2 positive cells in the aging process, we showed that the repeated elimination of these cells in mice causes the appearance of a phenotype of premature aging, which supports the hypothesis that states that during aging stem and progenitor cell population exhaustion occurs.

The results of this thesis, in short, provide more data that support the relevance of the study of stem cells and their biology in cancer and aging.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	33
1. CÉLULAS NAI	35
1.1. Definición e características das células nai	35
1.2. Clasificación das células nai	36
1.2.1. Clasificación das células nai segundo a súa orixe ontoxénica.....	36
1.2.2. Clasificación das células nai segundo o potencial de diferenciación	37
2. CÉLULAS NAI EMBRIONARIAS	38
2.1. Células nai embrionarias de rato	38
3. CÉLULAS NAI ADULTAS.....	43
4. REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	46
4.1. Reprogramación celular	46
4.2. Barreiras do proceso de reprogramación celular.....	49
4.3. Reprogramación celular e transformación oncoxénica	52
5. CÉLULAS NAI E CANCRO.....	54
5.1. Concepto de cancro	54
5.1.1. Evasión dos supresores de crecemento	54
5.1.1.1. Familia retinoblastoma das proteínas <i>pocket</i>	55
5.1.1.2. p53	56
5.2. Células nai e cancro	58
5.2.1. Similitudes entre as células nai e as células tumorais.....	58
5.2.2. As células nai como unha posible orixe das CSCs	59
5.2.3. Sinatura das ESCs en cancro.....	60
6. CÉLULAS NAI E AVELLENTAMENTO	61
6.1. Concepto de avellentamento.....	61
6.2. Esgotamento de células nai e avellentamento.....	62
6.2.1. Avellentamento das células nai adultas	62
6.2.2. Manifestacións funcionais do avellentamento das células nai adultas	64
6.2.2.1. Cambios relacionados coa idade no destino da proxenie das células nai adultas	65
6.2.2.2. Redución dos compartimentos de células nai adultas	65
6.2.2.3. Senescencia das células nai adultas.....	66
6.2.2.4. Transformación maligna das células nai adultas	66
7. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX2	67
7.1. Características xerais dos factores de transcripción Sox.....	67

ÍNDICE

7.2. Características xerais do factor de transcripción Sox2	68
7.2.1. Sox2 en ESCs e reprogramación celular	72
7.2.1.1. Sox2 en ESCs	72
7.2.1.2. Sox2 en reprogramación celular	73
7.2.2. Sox2 en células nai e proxenitoras adultas	74
7.2.3. Sox2 en cancro	76
7.2.4. Regulación transcricional de Sox2 polo supresor tumoral p27 ^{Kip1}	79
OBXECTIVOS	81
MATERIAL E MÉTODOS	85
1. RATOS MODIFICADOS XENETICAMENTE E TRATAMENTO	87
1.1. Condicións de estabulación	87
1.2. Ratos KO para as proteínas <i>pocket</i> (Rb, p107 e p130)	87
1.2.1. Rato <i>Rb</i> +/-	87
1.2.2. Rato <i>p107</i> -/-	87
1.2.3. Rato <i>p130</i> -/-	87
1.3. Rato reprogramable i4F	88
1.4. Rato Sox2-TK e tratamento con GCV	88
1.5. Rato <i>Rb</i> -het/Sox2-TK e tratamento con GCV	88
1.6. Xenotipado	88
2. CULTIVOS CELULARES	90
2.1. Cultivo primario de MEFs wt, <i>pRb</i> -/-, <i>p107</i> -/-, <i>p130</i> -/-, i4F e Sox2-TK	90
2.2. ESCs e iPSCs	91
2.3. Preparación de <i>feeders</i>	91
2.4. Liñas celulares e tratamento	91
2.4.1. Liñas celulares	91
2.4.2. Tratamentos	92
3. ELABORACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	93
3.1. Microorganismos utilizados e medios de cultivo de bacterias	93
3.1.1. Microorganismos utilizados	93
3.1.2. Medios de cultivo de bacterias	93
3.1.2.1. Medio líquido	93
3.1.2.2. Medio sólido	93
3.2. Obtención do DNA plasmídico	94
3.2.1. Minipreps	94
3.2.2. Midipreps	94
3.2.3. Maxipreps	94

3.3. Cuantificación da concentración do DNA	94
3.4. Comprobación do DNA plasmídico.....	94
3.4.1. Dixestión con encimas de restrición.....	94
3.4.2. Eletroforese en xel de agarosa.....	94
3.5. Plásmidos	95
4. TRANSFECCIÓN CELULAR.....	96
4.1. Transfección celular mediante o método de precipitación con fosfato cálcico	96
4.2. Transfección celular mediante o método de transfección con Polietilenimina (PEI) ...	97
5. TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL E LENTIVIRAL.....	98
6. REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	99
6.1. Reprogramación celular a iPSCs.....	99
6.2. Tinguidura Fosfatasa Alcalina (AP, <i>Alkaline Phosphatase</i>) das colonias iPSCs.....	99
6.3. Visualización das colonias iPSCs co plásmido reporteiro de pluripotencia PLSIN-EOS-C(3+)-EiP.....	99
6.4. Picado e expansión de colonias iPSCs.....	99
6.5. Ensaio de diferenciación <i>in vitro</i> das iPSCs a EBs	100
7. ANÁLISE DA EXPRESIÓN DE RNA.....	101
7.1. Extracción e cuantificación dos extractos de RNA	101
7.2. Análise dos extractos de RNA por PCR cuantitativa a tempo real (qRT-PCR, <i>quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>)	101
7.2.1. Síntese de cDNA por retrotranscrición.....	101
7.2.2. qRT-qPCR mediante <i>SYBR Green</i>	101
7.2.3. qRT-PCR mediante sondas <i>Taqman</i>	103
8. ANÁLISE DA EXPRESIÓN PROTEICA	104
8.1. Obtención de extractos proteicos.....	104
8.2. Cuantificación dos extractos proteicos mediante o método de Bradford.....	104
8.3. Análise dos extractos proteicos mediante Western blot	104
9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP, <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>)	107
10. ANÁLISE DA EXPRESIÓN DE GFP POR CITOMETRÍA DE FLUXO.....	109
11. ENSAIOS DE ACTIVIDADE LUCIFERASA E β -GALACTOSIDASA	110
11.1. Ensaio de actividade luciferasa	110
11.2. Ensaio de actividade β -galactosidasa.....	110
12. ENSAIO DE MIGRACIÓN CELULAR.....	111
13. ENSAIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	111

ÍNDICE

14. ENSAIO DE FORMACIÓN DE COLONIAS	111
15. TINGUIDURA CON GIEMSA	111
16. TINGUIDURA CON CRISTAL VIOLETA	112
17. AVALIACIÓN DA MASA HIPOFISARIA.....	112
18. AVALIACIÓN DA MASA CORPORAL	112
19. AVALIACIÓN DA CIFOSE	112
20. AVALIACIÓN DA CANICIE	113
21. AVALIACIÓN DA COMPOSICIÓN CORPORAL	113
22. ENSAIO DE COORDINACIÓN NEUROMUSCULAR	113
23. ENSAIO DE RECRECEMENTO DE PELO	113
24. ENSAIOS DE ACTIVIDADE β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA	113
24.1. Ensaio con substrato cromoxénico (X-Gal): Tinguidura β -galactosidasa	113
24.2. Ensaio con substrato quimioluminiscente (Galactón).....	114
25. ANÁLISE HISTOLÓXICA E INMUNOHISTOQUÍMICA	114
25.1. Tinguidura hematoxilina-eosina (H&E) de seccións de tecido incluídas en parafina .	115
25.2. Tinguidura Nuclear Fast Red (NFR) de seccións de tecido incluídas en OCT	116
25.3. Inmunohistoquímica encimática.....	116
26. MICROSCOPIA.....	118
27. ANÁLISE ESTATÍSTICA	118
RESULTADOS.....	119
1. REGULACIÓN DE SOX2 POR PROTEÍNAS POCKET EN CANCRO	121
1.1. As células carentes de <i>Rb</i> ou <i>p130</i> expresan niveis máis altos de <i>Sox2</i>	121
1.2. As proteínas <i>pocket</i> <i>pRb</i> e <i>p130</i> únense ao <i>enhancer Sox2-SRR2</i> e a súa ausencia altera as marcas epixenéticas no <i>enhancer</i>	125
1.3. As células que perden <i>Rb</i> poden reprogramarse sen <i>Sox2</i> ectópico.....	127
1.4. A eliminación parcial de células <i>Sox2</i> positivas mitiga o fenotipo tumoral hipofisario causado pola perda de <i>Rb</i> en ratos	131
2. REGULACIÓN DE SOX2 POR <i>p53</i> EN CANCRO	134
2.1. A alteración dos niveis de <i>p53</i> modula a expresión de <i>Sox2</i> en liñas celulares de can- cro de pulmón e glioblastoma humanas	135
2.2. A alteración dos niveis de <i>p53</i> modula a actividade transcripcional do promotor de <i>Sox2</i> en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas	136

2.3. A indución de p53 por Doxorrubicina, reprime a expresión de Sox2 en dúas liñas celulares de glioblastoma de rato	138
2.4. A ausencia de p53 bloquea a represión de Sox2 despois do tratamento con Doxorrubicina nas dúas liñas celulares de glioblastoma de rato	140
2.5. p53 únese ao promotor e a dúas rexións reguladoras de Sox2 denominadas <i>enhancer</i> SRR1 e SRR2	142
2.6. Xeración de liñas celulares tumorais con niveis incrementados de Sox2	143
2.7. O incremento dos niveis de Sox2 reduce a proliferación celular	147
2.8. O incremento dos niveis de Sox2 diminúe a capacidade de formación de colonias ..	148
2.9. O incremento dos niveis de Sox2 promove o proceso de EMT	150
2.10. O incremento dos niveis de Sox2 promove a migración celular	153
3. PAPEL DAS CÉLULAS NAI E PROXENITORAS ADULTAS SOX2 POSITIVAS EN AVELLENTAMENTO	155
3.1. A eliminación de células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas durante 54 semanas pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro	155
3.2. A eliminación das células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas durante 34 semanas xa pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro.....	159
3.2.1. Os ratos Sox2 ^{TK} presentan unha menor ganancia de masa corporal	159
3.2.2. A aparencia externa dos ratos Sox2 ^{TK} pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro	160
3.2.3. Os ratos Sox2 ^{TK} teñen menor capacidade de rexeneración de pelo pero non de coordinación neuromuscular	161
3.2.4. Os machos Sox2 ^{TK} , pero non as femias, teñen menor porcentaxe de masa graxa corporal...	162
3.2.6. Os ratos Sox2 ^{TK} tenden a expresar maiores niveis de inhibidores do ciclo celular e de compoñentes do SASP no ril	164
3.2.7. Algúns órganos dos ratos Sox2 ^{TK} presentan alteracións na súa homeostase tisular	166
DISCUSIÓN.....	169
1. REGULACIÓN DE SOX2 POR PROTEÍNAS POCKET EN CANCRO	171
2. REGULACIÓN DE SOX2 POR p53 EN CANCRO	176
3. PAPEL DAS CÉLULAS NAI E PROXENITORAS ADULTAS SOX2 POSITIVAS EN AVELLENTAMENTO	181
CONCLUSIÓN.....	185
BIBLIOGRAFÍA.....	189

ABREVIATURAS



AEG: Anophthalmia-Esophageal-Genital syndrome, **síndrome anoftálmico-esofágico-xenital.**

AP: Alkaline Phosphatase, **fosfatasa alcalina.**

ATP: Adenosine Triphosphate, **adenosín trifosfato.**

Bcl-2: B-cell Lymphoma 2, **linfoma de células B 2.**

BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4, **proteína morfoxenética ósea 4.**

BMPR1: Bone Morphogenetic Protein Receptor 1, **receptor de proteína morfoxenética ósea 1.**

BMPR2: Bone Morphogenetic Protein Receptor 2, **receptor de proteína morfoxenética ósea 2.**

BMPs: Bone Morphogenetic Proteins, **proteínas morfoxenéticas óseas.**

BSA: Bovine Serum Albumin, **albúmina de soro bovino.**

CC: Cholangiocarcinoma, **colanxiocarcinoma.**

CDK2: Cyclin-dependent kinase 2, **quinasa dependiente de ciclina 2.**

CDK4: Cyclin-dependent kinase 4, **quinasa dependiente de ciclina 4.**

CDK6: Cyclin-dependent kinase 6, **quinasa dependiente de ciclina 6.**

CDKIs: Cyclin Dependent Kinase Inhibitors, **inhibidores de quinasa dependientes de ciclina.**

CDKs: Cyclin-dependent kinases, **quinasas dependientes de ciclina.**

cDNA: complementary DNA, **ADN complementario.**

CFU-F: Fibroblasts-Colony Forming Units, **unidades formadoras de colonias-fibroblastos.**

CFU-S: Spleen-Colony Forming Units, **unidades formadoras de colonias-bazo.**

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation, **inmunoprecipitación de cromatina.**

c-Myc: v-Myc myelocytomatosis avian viral oncogene homolog, **oncoxene viral homólogo de Mielocitomatose aviar v-myc.**

Cnot3: CCR4-not Transcription Complex Subunit 3, **subunidade 3 do complexo de transcripción CCR4-not.**

CNS: Central Nervous System, **Sistema Nervioso Central.**

CSCs: Cancer Stem Cells, **células nai do cancro.**

CSR: Consensus Stemness Ranking.

CTCF: CCCTC-Binding Factor, **factor de unión a CCCTC.**

DAB: Diaminobenzidine, **diamino-bencidina.**

Dax1: Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on X chromosome gene 1, **xene 1 da rexión crítica do cromosoma X en DSS-ACH.**

Dlx3: Distal-less homeobox 3, **distal menos homeobox 3.**

ABREVIATURAS

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, **medio de Eagle modificado por Dulbecco.**

DMSO: Dimethyl sulfoxide, **dimetil sulfóxido.**

DNA: Deoxyribonucleic acid, **ácido desoxirribonucleico.**

Dnmt1: DNA methyltransferase 1, **ADN metiltransferasa 1.**

dNTPs: Deoxynucleotide triphosphates, **deoxinucleótidos trifosfato.**

Doxi: Doxycycline, **doxiciclina.**

Doxo: Doxorubicin, **doxorrubicina.**

DTT: Dithiothreitol, **ditiotreitol.**

EBs: Embryoid Bodies, **corpos embrioides.**

ECM: Extracellular Matrix, **matriz extracelular.**

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, **ácido etilendiaminotetraacético.**

EGTA: Ethyleneglycoltetraacetic acid, **ácido etilenglicoletraacético.**

Ehmt1: Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 1, **histona-lisina N-metiltransferasa 1 eucromática.**

Ehmt2: Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2, **histona-lisina N-metiltransferasa 2 eucromática.**

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition, **transición epitelio-mesenquima.**

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase, **quinasa regulada por sinais extracelulares.**

ESCs: Embryonic Stem Cells, **células nai embrionarias.**

Esrrb: EStrogen Related Receptor Beta, **receptor beta relacionado con estrógenos.**

FBS: Fetal Bovine Serum, **soro fetal bovino.**

FGF: Fibroblast Growth Factor, **factor de crecimiento de fibroblastos.**

FGF4: Fibroblast Growth Factor 4, **factor de crecimiento de fibroblastos 4.**

Gata4: GATA binding protein 4, **proteína 4 de unión a GATA.**

GCV: Ganciclovir.

GFP: Green Fluorescent Protein, **proteína verde fluorescente.**

gp130: Glycoprotein 130, **glicoproteína 130.**

GSK3: Glycogen Synthase Kinase-3, **glucóxeno sintasa quinasa-3.**

H&E: Hematoxylin and Eosin, **Hematoxilina e Eosina.**

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution, **solución salina balanceada de Hank.**

HCC: Hepatocellular carcinoma, **carcinoma hepatocelular.**

HeBS: Hepes-buffered saline solution, **solución salina tamponada con Hepes.**

HEK293T: Human Embryonic Kidney 293T, **células embrionarias de riñ humano 293T.**

hESCs: Human Embryonic Stem Cells, **células nai embrionarias humanas.**
HFSCs: Hair Follicle Stem Cells, **células nai do folículo piloso.**
HG: Hair Germ, **xerme do pelo.**
HMG: High mobility group, **grupo de alta mobilidade.**
Hmgb1: High mobility group box 1, **proteína de grupo de alta mobilidade caixa 1.**
HMTs: Histone methyltransferases, **histona metiltransferasas.**
HNSCC: Head Neck Squamous Cell Carcinomas, **carcinoma de célula escamosa de pescozo e cabeza.**
HP-1: Heterochromatin protein-1, **proteína da heterocromatina 1.**
HRP: Horseradish Peroxidase, **peroxidasa de rábano.**
HSC: Hematopoietic Stem Cell, **célula nai hematopoética.**
HSTK: Herpes Simplex Thymidine Kinase, **Timidina quinasa do Herpes Simple.**
HSV-1: Herpes Simplex Virus-1, **Virus do Herpes Simple tipo 1.**
ICM: Inner Cell Mass, **masa celular interna.**
Id-1: Inhibitor of Differentiation-1, **inhibidor de diferenciación 1.**
iPSCs: Induced Pluripotent Stem Cells, **células nai pluripotentes inducidas.**
JAK: Janus kinase, **quinasa Janus.**
kb: Kilobase.
KD: Knockdown.
kDa: Kilodaltons.
KI: Knockin.
Klf2: Kruppel-Like Factor 2, **factor tipo Kruppel 2.**
Klf4: Kruppel-Like Factor 4, **factor tipo Kruppel 4.**
KO: Knockout.
KSR: Knockout Serum Replacement.
LB: Luria-Broth.
Lef1: Lymphoid enhancer binding factor 1, **factor de union ao enhancer linfoide 1.**
LIF: Leukemia Inhibitory Factor, **Factor Inhibidor da Leucemia.**
LT: Large-T, **T grande.**
M2-rtTA: Reverse tetracycline-dependent transactivator, **transactivador reverso dependente de tetraciclina.**
MAP: Mitogen Activated Protein, **proteína activada por mitóxenos.**
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase, **proteína quinasa activada por mitóxenos.**
Mdm2: Murine Double Minute 2, **doble minuto murino 2.**
MDM4: Murine Double Minute 4, **doble minuto murino 4.**

ABREVIATURAS

- MEFs:** Mouse Embryonic Fibroblasts, **fibroblastos embrionarios de rato.**
- mESCs:** Mouse Embryonic Stem Cells, **células nai embrionarias de rato.**
- MET:** Mesenchymal-Epithelial Transition, **transición mesénquima-epitelio.**
- miRNA:** microRNA, **microARN.**
- mRNA:** Messenger RNA, **ARN mensaxeiro.**
- MSCs:** Mesenchymal Stem Cells, **células nai mesenquimais.**
- NEAA:** Non-essential amino acids, **aminoácidos non esenciais.**
- NES:** Nuclear Export Signals, **sinais de exportación nuclear.**
- NFR:** Nuclear Fast Red, **vermello lonxano nuclear.**
- NIS:** Nuclear Import Signals, **sinais de importación nuclear.**
- Nkx2.5:** NK2 homeobox 5.
- NPCs:** Neural Progenitor Cells, **células proxenitoras neurais.**
- NSCLC:** Non Small Cell Lung Carcinoma, **carcinoma de pulmón de célula non pequena.**
- NSCs:** Neural Stem Cells, **células nai neurais.**
- OCT:** Optimal Cutting Temperature, **temperature óptima de corte.**
- Oct4:** Octamer-binding Transcription Factor 4, **Factor de transcripción de unión a octámeros 4.**
- ONPG:** 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside, **2-Nitrofenil β -D-galactopiranosido.**
- OSCC:** Oral Squamous Cell Carcinomas, **carcinoma de célula escamosa oral.**
- OSKM:** Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc.
- Paf1C:** Polymerase-Associated Factor 1 Complex, **complexo do factor 1 asociado coa polimerasa.**
- PBS:** Phosphate Buffered Saline, **tampón fosfato salino.**
- PcG:** Polycomb group, **grupo Polycomb.**
- PCR:** Polymerase Chain Reaction, **reacción en cadea da polimerasa**
- PEI:** Polyethylenimine, **Polietilenimina.**
- PI3K:** Phosphatidylinositol-3-kinase, **fosfatidilinositol-3-quinasa.**
- PRC:** Polycomb-group repressive protein complex, **complexo proteico represivo do grupo Polycomb.**
- PVDF:** Polyvinylidene fluoride, **fluoruro de polivinilideno.**
- qRT-PCR:** quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, **reacción en cadea da polimerasa cuantitativa a tempo real.**
- RA:** Retinoic Acid, **ácido retinoico.**
- Rb:** Retinoblastoma protein, **proteína do retinoblastoma.**
- RIPA:** Radio-Immunoprecipitation Assay, **ensaio de radioinmunoprecipitación.**

RNA: Ribonucleic acid, **ácido ribonucleico.**

Sall4: Spalt-Like Transcription Factor 4, **factor de transcripción tipo Spalt 4.**

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype, **fenotipo secretor asociado a senescencia.**

SCC: Squamous Cell Carcinoma, **carcinoma de célula escamosa.**

SCLC: Small Cell Lung Cancer, **cancro de pulmón de célula pequena.**

SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer, **transferencia nuclear de célula somática.**

SCR: Sox2 Control Region, **rexión control de Sox2.**

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, **dodecil sulfato sódico.**

SE: Super-enhancer.

SetDB1: SET Domain Bifurcated 1, **dominio SET bifurcado 1.**

Shh: Sonic hedgehog, **ourizo Sonic.**

shRNA: short hairpin RNA, **ARN de garfo curto.**

Smad1: SMAD Family Member 1, **membro da familia SMAD 1.**

Smad4: SMAD Family Member 4, **membro da familia SMAD 4.**

Smad5: SMAD Family Member 5, **membro da familia SMAD 5.**

Smad8: SMAD Family Member 8, **membro da familia SMAD 8.**

Sox1: SRY (sex determining region Y)-box 1, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y-caixa 1.**

Sox15: SRY (sex determining region Y)-box 15, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y-caixa 15.**

Sox18: SRY (sex determining region Y)-box 18, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y-caixa 18.**

Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y-caixa 2.**

Sox3: SRY (sex determining region Y)-box 3, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y-caixa 3.**

Sox7: SRY (sex determining region Y)-box 7, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y-caixa 7.**

SPF: Specific Pathogen Free, **libre de patóxenos específicos.**

SRR1: Sox2 Regulatory Region 1, **rexión reguladora de Sox2 1.**

SRR2: Sox2 Regulatory Region 2, **rexión reguladora de Sox2 2.**

Sry: Sex-determining region Y, **rexión determinante do sexo do cromosoma Y.**

SSEA-3: Stage Specific Embryonic Antigen 3, **antíxeno embrionario específico de etapa 3.**

SSEA-4: Stage Specific Embryonic Antigen 4, **antíxeno embrionario específico de etapa 4.**

ABREVIATURAS

Stat3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, **transductor de sinal e activador da transcrición 3.**

SV40: *Simian Virus 40*, **virus do simio 40.**

TA: *Transit-Amplifying cells*, **células amplificadoras de transición.**

TAM: *Tamoxifen*, **Tamoxifeno.**

Tbx3: *T-Box transcription factor 3*, **factor de transcripción T-Box 3.**

Tcf3: *Transcription Factor 3*, **factor de transcripción 3.**

Tcf4: *Transcription Factor 4*, **factor de transcripción 4.**

Tcf7: *Transcription factor 7*, **factor de transcripción 7.**

TE: *Trophectoderm*, **trofoectodermo.**

tetOP: *Tetracycline-dependent promoter*, **promotor dependente de tetraciclina.**

Tfcp2l1: *Transcription factor CP2-like 1*, **factor de transcripción CP2-tipo 1.**

TFG- β : *Transforming Growth Factor β* , **factor de crecemento transformante β .**

TFs: *Transcription Factors*, **factores de transcripción.**

TICs: *Tumor Initiating Cells*, **células iniciadoras de tumores.**

Trim28: *Tripartite motif-containing 28*, **motivo tripartito 28.**

UV: *Ultraviolet*, **ultravioleta.**

wt: *wild type*, **tipo salvaxe.**

X-Gal: *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside*, **5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactósido.**

Zfp281: *Zinc Finger Protein 281*, **proteína dedo de Zinc 281.**

INTRODUCCIÓN



1. CÉLULAS NAI

A primeira evidencia que suxeriu a existencia das células nai foi en 1961, cando dous científicos, o Dr. James A. Till, un biofísico e, Ernest A. McCulloch, un hematólogo de profesión, observaron accidentalmente que a inxección intravenosa de células da medula ósea nun rato irradiado previamente conduciu á formación de colonias de células proliferantes no bazo destes animais. As células inxectadas eran células proxenitoras que forman o sangue, capaces de rexenerar completamente as células do sangue e abrir camiño cara o uso clínico do transplante de medula ósea para trastornos hematopoéticos (Till, J.E. and McCulloch, E.A., 1961). Dende entón, ao longo destes anos illáronse, identificáronse e caracterizáronse diferentes tipos de células nai.

Hoxe en día, o campo da investigación con células nai está en expansión, sendo unha das áreas máis importantes das ciencias da vida. A importancia de estudar a bioloxía das células nai basease na súa ampla gama de aplicacións. En investigación básica, as células nai representan un sistema poderoso para estudar a función de xenes e os procesos fisiolóxicos que acontecen durante o desenvolvemento. Na investigación biomédica as células nai úsanse para estudar a patoxénese de enfermidades xenéticas humanas, identificar novos biomarcadores diagnóstico e prognóstico e probar fármacos. Non obstante, o que fai a investigación con células nai importante é o enorme potencial das aplicacións clínicas destas células. A súa capacidade para diferenciarse en tipos celulares específicos podería usarse en medicina rexenerativa para tratar tecidos danados a través de terapias de emprazamento celular (Romito, A. and Cobellis, G., 2016).

1.1. Definición e características das células nai

As células nai atópanse en todos os organismos multicelulares e defínense funcionalmente como células que son capaces de autorrenovarse para producir células nai fillas con propiedades idénticas á célula nai orixinal e diferenciarse xerando diversos tipos celulares especializados (Smith, A.G., 2001; Weissman, I.L. et al., 2001). A continuación descríbense as dúas características principais que presentan as células nai (**Figura 1**):

- **Autorrenovación:**

A autorrenovación é o proceso polo cal unha célula nai se divide de forma asimétrica ou simétrica para xerar unha ou dúas células nai fillas que teñen un potencial de desenvolvemento similar ao da célula nai orixinal. A capacidade de autorrenovación é esencial para que as células nai expandan o seu número durante o desenvolvemento, para que se manteñan dentro dos tecidos adultos e restauren o conxunto de células nai despois dun dano. Defectos nos mecanismos de autorrenovación poden conducir a defectos no desenvolvemento, fenotipos de avellentamento prematuro e cancro (He, S. et al., 2009).

- **Potencial ou capacidade de diferenciación:**

As células nai son células indiferenciadas que teñen un enorme potencial para dar lugar a diferentes tipos celulares especializados durante o desenvolvemento e o organismo adulto, como células do músculo cardíaco, células do sangue, células nerviosas etc., mediante un proceso que se denomina diferenciación. Este proceso está estritamente regulado a nivel molecular e influenciado por factores exógenos procedentes do ambiente celular (Weissman, I.L. et al., 2001).

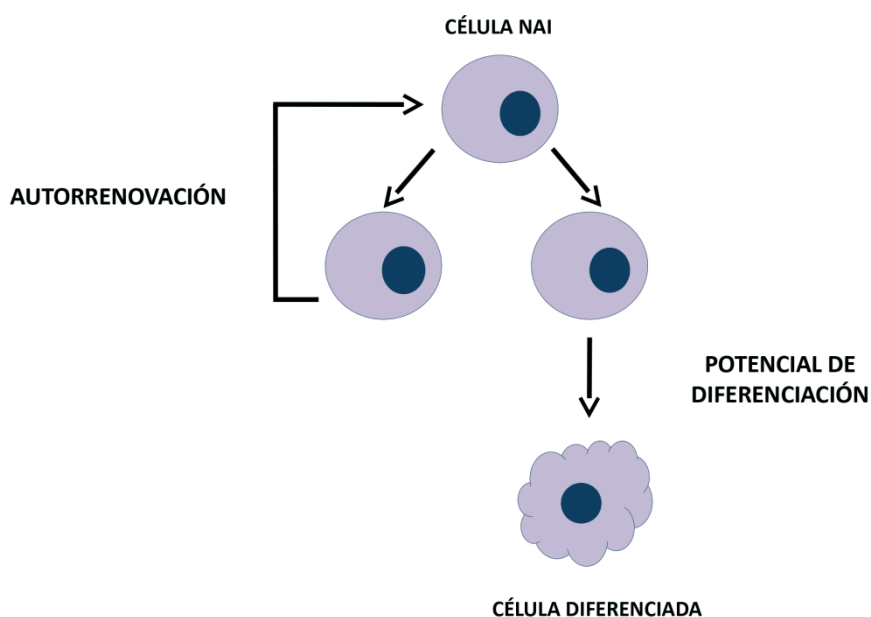


Figura 1. Características principais das células nai, a autorrenovación e o potencial de diferenciación.

1.2. Clasificación das células nai

As células nai poden clasificarse en base á súa orixe ontoxénica ou ao seu potencial de diferenciación (**Figura 2**).

1.2.1. Clasificación das células nai segundo a súa orixe ontoxénica

As células nai poden clasificarse segundo a súa orixe ontoxénica nos 4 tipos celulares que se describen a continuación:

- **Células nai embrionarias (ESCs, Embryonic Stem Cells):** as ESCs derivan da masa celular interna (ICM, Inner Cell Mass) de blastocistos e teñen a capacidade de crecer indefinidamente mentres se manteñen nun estado pluripotente e de diferenciarse nos tipos celulares das tres capas xerminais (ectodermo, endodermo e mesodermo) (Evans, M.J. and Kaufman, M.H., 1981; Martin, G.R., 1981; Thomson, J.A. et al., 1998).

- **Células nai pluripotentes inducidas (iPSCs, Induced Pluripotent Stem Cells):** son células nai pluripotentes xeradas a partir de células adultas mediante un proceso denominado reprogramación celular. Estas células teñen as mesmas propiedades que as ESCs, xa que se autorrenovan e poden diferenciarse a tipos celulares das tres capas embrionarias (Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006; Takahashi, K. et al., 2007; Yu, J. et al., 2007).
- **Células nai fetais:** as células nai fetais son células multipotentes que se atopan nun tecido fetal específico (sangue fetal do cordón umbilical, medula ósea fetal, fígado, ril, pulmóns, placenta etc.) e que se diferencian en tipos celulares maduros dentro do tecido ou órgano particular no que se atopan (O'Donoghue, K. and Fisk, N.M., 2004).
- **Células nai adultas:** as células nai adultas son células indiferenciadas que se atopan nunha gran parte de tecidos (sangue, pel, intestino, músculo etc.) no organismo adulto que son capaces de autorrenovarse e de diferenciarse a un número limitado de tipos celulares maduros que forman parte do tecido no que residen. A súa proxenie substitúe as células que se perden debido á renovación celular ou dano, asegurando así o mantemento da homeostase tisular (Wagers, A.J. and Weissman, I.L., 2004).

1.2.2. Clasificación das células nai segundo o potencial de diferenciación

As células nai poden clasificarse segundo o potencial de diferenciación nos 5 tipos celulares que se describen a continuación:

- **Células nai totipotenciais:** están presentes no cigoto até que logran a formación de 8 células. Estas células son capaces de formar un organismo viable completo, xa que se diferencian a tipos celulares embrionarios das tres capas xerminais (ectodermo, endodermo e mesodermo) e extraembrionarios, como a placenta (Girlovanu, M. et al., 2015; Weissman, I.L., 2000).
- **Células nai pluripotenciais:** estas células íllanse da ICM do blastocisto e son capaces de formar células das tres capas embrionarias perdendo a capacidade de formar células extraembrionarias, e polo tanto, un organismo completo. As ESCs e iPSCs pertencen a este tipo de células nai (Girlovanu, M. et al., 2015).
- **Células nai multipotenciais:** atópanse en organismos fetais en proceso de evolución e tamén en organismos adultos. Poden diferenciarse a un número limitado de células que se restrinxen a unha certa capa xerminal. Por exemplo, unha célula nai sanguínea será capaz de orixinar exclusivamente diferentes tipos celulares maduros e funcionais hematopoéticos (Bindu A, H. and B, S., 2011; Girlovanu, M. et al., 2015).
- **Células nai oligopotenciais:** estas células só poden diferenciarse a uns poucos tipos de células, por exemplo, as células nai linfoides ou mieloides (Bindu A, H. and B, S., 2011).

- **Células nai unipotenciais:** atópanse nos organismos adultos e son capaces de diferenciarse a un único tipo de célula, como son as células nai musculares (Bindu A, H. and B, S., 2011; Girlovanu, M. et al., 2015).

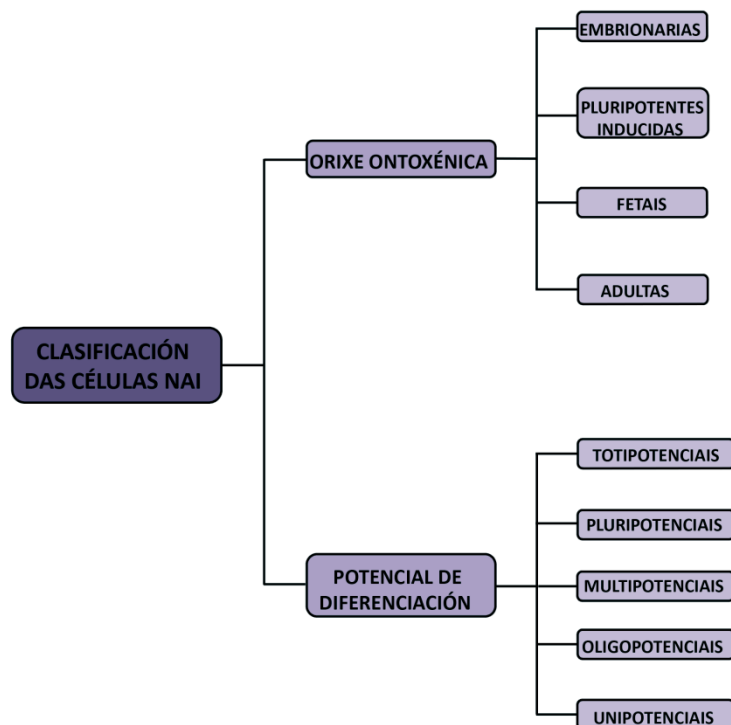


Figura 2. Clasificación das células nai segundo a súa orixe ontóxénica ou o seu potencial de diferenciación.

2. CÉLULAS NAI EMBRIONARIAS

O primeiro evento de diferenciación durante o desenvolvemento dos mamíferos é a segregación do trofoectodermo (TE, *trophectoderm*) e a ICM no estado de mórula tardía. O TE dá lugar á capa externa da placenta e a ICM forma o endodermo primitivo e o epiblasto, que durante a gastrulación dá lugar ás tres capas xerminais primordiais e en última instancia, a todos os tipos celulares do embrión propiamente dito. As células nai embrionarias son liñas celulares inmortais que derivan da ICM de blastocistos humanos e de rato que se caracterizan por ser células indiferenciadas que se manteñen e expanden indefinidamente debido á autorrenovación e que se diferencian a todos os tipos celulares que se atopan no organismo adulto, grazas a súa capacidade pluripotente (Yu, J. and Thomson, J.A., 2008).

2.1. Células nai embrionarias de rato

As células nai embrionarias de rato (mESCs, *Mouse Embryonic Stem Cells*) illáronse por primeira vez en 1981 da ICM de blastocistos de rato, a parte que dará lugar ao embrión. Estas células establecéronse e mantivéronse orixinalmente en presenza de soro en fibroblastos embrionarios de rato (MEFs, *Mouse Embryonic*

Fibroblasts) que actúan como células alimentadoras (*feeders*) (Evans, M.J. and Kaufman, M.H., 1981; Martin, G.R., 1981). As mESCs derivadas clonalmente a partir dunha única célula foron capaces de manterse indefinidamente en cultivo crescendo en forma de colonias, de diferenciarse nunha ampla variedade de tipos de células *in vitro* e de formar teratocarcinomas cando se inxectan en ratos (Martin, G.R., 1981). As mESCs cariotípicamente normais tamén puideron contribuír en alta frecuencia a unha variedade de tecidos en quimeras, incluíndo as células xerminais, proporcionando así unha forma práctica de introducir modificacións na liña xerminar do rato (Bradley, A. et al., 1984).

O mantemento do estado de pluripotencia nas mESCs depende de factores e vías de sinalización extrínsecas e intrínsecas.

- **Factores e vías de sinalización extrínsecas do estado pluripotente:**

Orixinalmente empregáronse capas de células *feeders* inactivadas mitoticamente como soporte para o cultivo de mESCs (Evans, M.J. and Kaufman, M.H., 1981) ao igual que medios condicionados por cocultivo con varias células que neste caso son capaces de manter as mESCs en ausencia de *feeders*. O fraccionamento dos medios condicionados conduciu á identificación do Factor Inhibidor da Leucemia (LIF, *Leukemia Inhibitory Factor*), unha citoquina que mantén a autorrenovación e o estado pluripotente das mESCs (Smith, A.G. et al., 1988; Williams, R.L. et al., 1988). A interacción de LIF co receptor gp130 na superficie celular activa Stat3, un efector *downstream* de múltiples vías intracelulares, como JAK/Stat3, PI3K/Akt e MAP/ERK (Hirai, H. et al., 2011). En resposta á activación destas vías, Stat3 fosforílase e forma homodímeros ou heterodímeros que se translocan do citoplasma ao núcleo, onde se unen a elementos específicos de DNA que activan a transcrición de factores de pluripotencia como Oct4 (*Octamer-binding Transcription Factor 4*), Sox2 (*SRY (sex determining region Y)-box 2*) e Nanog que foron identificados entre outros, como reguladores positivos que inducen o mantemento da autorrenovación e o estado indiferenciado das mESCs (Jaenisch, R. and Young, R., 2008; Romito, A. and Cobellis, G., 2016; Ying, Q.-L. et al., 2003) (**Figura 3A**). No intento de atopar moléculas capaces de garantir a autorrenovación, identificouse ao factor de transcrición CP2-tipo 1 (*Tfcp2l1, Transcription factor CP2-like 1*) como unha diana da vía mediada por LIF/STAT3 que controla a autorrenovación de mESCs (Ye, S. et al., 2013).

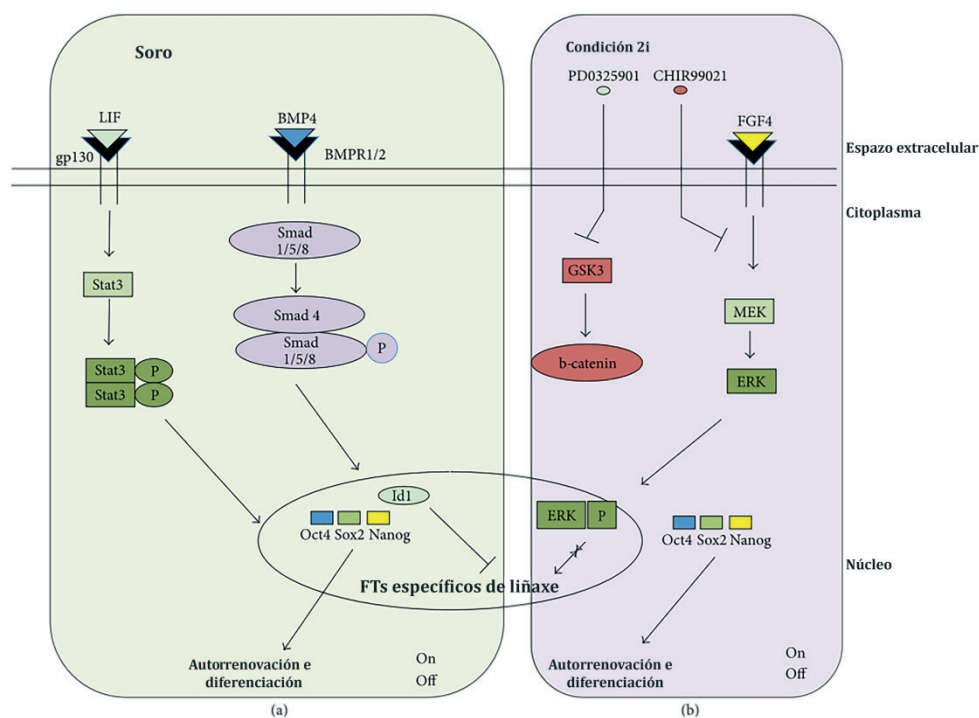


Figura 3. Vías de transducción de sinal en mESCs cultivadas en soro (A) ou cultivadas con dous inhibidores químicos (PD0325901 e CHIR99021) (B)
(Imaxe adaptada de Romito, A. and Cobellis, G., 2016).

Non obstante, o LIF por si só non é suficiente para manter a autorrenovación das mESCs, xa que as células tamén requiren a presenza de soro fetal bovino. As proteínas morfoxenéticas óseas (BMPs, *Bone Morphogenetic Proteins*), membros da familia do factor de crecemento transformante β ((TFG)- β , *Transforming Growth Factor β*), presentes no soro actúan xunto co LIF mellorando a autorrenovación e pluripotencia das mESCs (Itoh, F. et al., 2014; Ying, Q.-L. et al., 2003). A unión de BMP4 ao seus receptores (BMPR1/2) desencadea a fosforilación de proteínas Smad (Smad1, Smad5 e Smad8). Unha vez fosforiladas, forman un complexo con Smad4 e translócanse ao núcleo (Massagué, J. et al., 2005), onde activan a expresión do inhibidor do xene de diferenciación (Id) 1 (Id-1, *Inhibitor of Differentiation-1*), crítico para suprimir a diferenciación e manter a pluripotencia das mESCs (Ying, Q.-L. et al., 2003). A sobreexpresión de Id1 conduce a que as mESCs se autorrenoven en ausencia de BMP4 e a súa interrupción conduce a unha diminución na expresión de Nanog e que o mantemento da autorrenovación das mESCs non se leve a cabo (Romero-Lanman, E.E. et al., 2012) (**Figura 3A**).

Polo tanto, as vías de sinalización de LIF e BMP xogan un papel central no mantemento do fenotipo pluripotente. En ausencia de calquera suplemento no medio de cultivo, as mESCs tenden a perder a súa pluripotencia e capacidade de autorrenovación debido á secreción do factor de crecemento de fibroblas-

tos 4 (FGF4, *Fibroblast Growth Factor 4*) por parte das células e a concomitante activación da vía MAPK, o que conduce á diferenciación das mESCs. A inhibición da diferenciación mediada pola vía de FGF4 pode, polo tanto, perpetuar o estado pluripotente (Kunath, T. et al., 2007).

Baseándose nesta observación, Austin Smith e colaboradores foron os pioneiros no uso de moléculas pequenas inhibidoras para bloquear a vía FGF4 a través de MEK e a inhibición de GSK3, o que permite que as mESCs crezan en condicións mínimas, en medio libre de soro. Eles atoparon que a inhibición simultánea das vías MAPK e GSK3 por PD0325901 e CHIR99021 (2i) respectivamente permitiu a propagación das mESCs mantendo a pluripotencia (Ying, Q.-L. et al., 2008) (**Figura 3B**). O estado pluripotente lógrase mediante a represión do eixo de prodiferenciación Mek/Erk/Klf2 (Yeo, J.-C. et al., 2014).

A partir de aí moitos laboratorios comezaron a cultivar mESCs sen soro usando estes dous inhibidores de quinasa (2i). As mESCs crecidas en medio 2i teñen unha morfoloxía máis homoxénea e presentan un perfil de expresión xénica máis uniforme que as mESCs crecidas en soro, que agora representa un sistema menos atractivo por varias razóns, entre elas, que as mESCs cultivadas en soro son morfoloxicamente heteroxéneas, propensas á aneuploidia e teñen o potencial de diferenciación alterado, como resultado das flutuacións na expresión de factores de pluripotencia e específicos de liñaxe (Marks, H. et al., 2012).

- **Factores e vías de sinalización intrínsecas do estado pluripotente:**

Ademais das sinais e vías de sinalización extrínsecas, existe unha rede reguladora de factores de transcrición (TFs, *Transcription Factors*), cofactores e factores epixenéticos que propagan uns programas de expresión xénica que sustentan e manteñen a pluripotencia. Nas mESCs, o estado de pluripotencia é regulado principalmente por un núcleo de factores de transcrición constituído por Oct4, Sox2 e Nanog. Oct4 xoga un papel central na pluripotencia das mESCs e a súa expresión confínase estritamente ás células totipotentes, pluripotentes e xerminais durante o desenvolvemento temperá. *In vitro*, o nivel celular de Oct4 debe estar estreitamente controlado para manter o estado de pluripotencia xa que unha redución do 50% causa a diferenciación espontánea cara TE, mentres *in vivo*, a supresión de Oct4 en rato conduce ao deterioro da ICM. Sox2 presenta un patrón de expresión similar ao de Oct4 durante o desenvolvemento. Cambios na expresión de Sox2 nas mESCs desencadea a diferenciación: por unha parte, a sobreexpresión induce a diferenciación cara células neuroectodermas mentres que a eliminación de Sox2 resulta na diferenciación a TE. A supresión de Sox2 *in vivo* provoca letalidade embrionaria debido a un forte deterioro da ICM. Por último, Nanog non só é expresado na ICM senón tamén nas células epiblasticas do embrión. De maneira similar a Oct4 e Sox2, os embrións deficientes en Nanog non se desenvolven. Tanto Oct4 como Sox2 son requiridos tanto para a adquisición como o mantemento da pluripotencia, mentres que Nanog só é crucial para a adquisición desta

INTRODUCCIÓN

(Bieberich, E. and Wang, G., 2013; Chen, L., 2012; Hackett, J.A. and Surani, M.A., 2014). Este núcleo de factores de transcripción actúan xuntos para regular positivamente os seus propios promotores, formando un bucle autoregulatorio interconectado. Por outra parte, estes factores ocupan e activan a expresión de xenes necesarios para o mantemento da pluripotencia, mentres contribúen á represión de xenes que codifican factores de transcripción específicos de liñaxe, cuxa ausencia axuda a previr a saída do estado pluripotente. Ademais do núcleo de factores de transcripción (Oct4/Sox2/Nanog), hai outros factores de transcripción asociados como c-Myc (*v-Myc myelocytomatosis avian viral oncogene homolog*), Klf2 (*Kruppel-Like Factor 2*), Klf4 (*Kruppel-Like Factor 4*), Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), Sall4 (*Spalt-Like Transcription Factor 4*), Zfp281 (*Zinc Finger Protein 281*), Esrrb (*EStrogen Related Receptor Beta*), Tbx3 (*T-Box transcription factor 3*), Tcf3 (*Transcription Factor 3*), Tcf4 (*Transcription Factor 4*), Smad1 (*SMAD Family Member 1*), Sox18 (*SRY(sex determining region Y)-box 18*) etc., e cofactores transcripcionais que non se unen ao DNA por si mesmos e actúan como coactivadores e corepresores, como Cnot3 (*CCR4-not Transcription Complex, Subunit 3*), Trim28 (*Tripartite motif-containing 28*), Paf1C (*Polymerase-Associated Factor 1 Complex*), Dax1 (*Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on X chromosome gene 1*), e os complexos Mediador e Cohesina, que tamén participan na regulación da pluripotencia das células nai (**Figura 4**) (Bieberich, E. and Wang, G., 2013; Chen, L., 2012; Young, R.A., 2011).

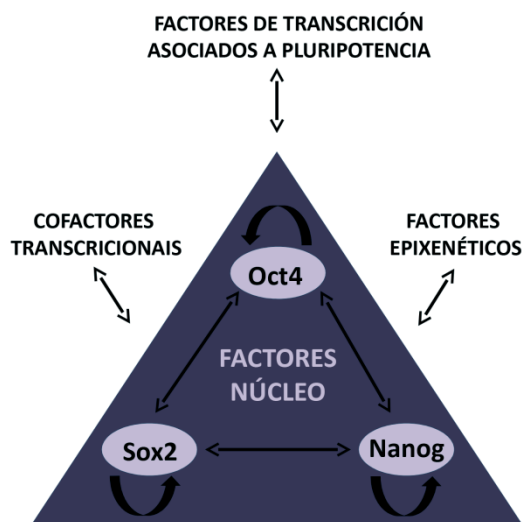


Figura 4. Representación esquemática da regulación transcripcional do núcleo dos factores de transcripción xunto con factores de transcripción asociados, cofactores e factores epixenéticos implicados no mantemento da pluripotencia nas mESCs (Imaxe adaptada de Bieberich, E. and Wang, G., 2013 e Chen, L., 2012).

Aparte dos factores de transcripción e cofactores anteriormente mencionados, os factores epixenéticos, tamén foron considerados por xogar un papel vital na pluripotencia (**Figura 4**). Estes mecanismos inclúen modificacións covalentes de histonas, metilación e acetilación do DNA e RNAs non codificantes. Por exemplo, dentro dos RNAs non codificantes, algúns membros da familia dos microRNAs (miRNAs), que son RNAs curtos capaces de desestabilizar e reprimir RNAs diana específicos, están implicados na regulación da pluripotencia. Outro exemplo son os factores remodeladores de cromatina que son recrutados ao DNA para modificar a densidade de nucleosomas, afectando polo tanto á expresión xénica. Entre os factores remodeladores de cromatina, os que presentan un maior impacto na pluripotencia das mESCs son os encimas modificadores de histonas, como os complexos de proteína do grupo Polycomb (PcG, *Polycomb group*), SetDB1 (*SET Domain Bifurcated 1*) e o complexo Tip60-p400. Estes encimas reprimen xenes que codifican reguladores de diferenciación específicos de liñaxe catalizando a metilación ou ubiquinización das histonas nos seus promotores (Bieberich, E. and Wang, G., 2013; Chen, L., 2012; Morey, L. et al., 2015).

3. CÉLULAS NAI ADULTAS

A célula nai hematopoética (HSC, *Hematopoetic Stem Cell*), foi a primeira célula nai illada da medula ósea de rato en 1961 por Ernest A. McCulloch e James E. Till, baixo o nome de unidades formadoras de colonias-bazo (CFU-S, *Spleen-Colony Forming Units*) (Till, J.E. and McCulloch, E.A., 1961). Máis tarde, en 1982, Friedenstein illou e describiu outro grupo de células, tamén localizadas na medula ósea, que presentaban características de células nai pero que tiñan un panel máis amplo de diferenciación que as HSCs. A estas células chamóuselle unidades formadoras de colonias-fibroblastos (CFU-F, *Fibroblasts-Colony Forming Units*), agora coñecidas como células nai mesenquimais (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*) (Friedenstein, A.J. et al., 1982).

As células nai adultas, tamén coñecidas como células nai somáticas ou células nai específicas de tecido, son unha poboación pequena de células indiferenciadas que se atopan en moitos tecidos do organismo adulto (sangue, pel, intestino, músculo, etc.) e que son capaces de substituírse a si mesmas mediante a autorrenovación e de diferenciarse en moitos (multipotente), varios (oligopotente) ou un (unipotente) tipo celular maduro e funcional no tecido onde se atopan. Dentro dos diferentes tecidos, as células nai residen en microambientes locais específicos denominados nichos que proporcionan o soporte estrutural e as sinais moleculares para regular a quiescencia, autorrenovación e activación das células nai durante o mantemento tisular (Hsu, Y.-C. and Fuchs, E., 2012; Rezza, A. et al., 2014; Wagers, A.J. and Weissman, I.L., 2004). As diferentes poboacións de células nai adultas expresan un ou varios marcadores específicos que permiten a súa identificación e caracterización dentro dos tecidos onde residen (Goodell, M.A. et al., 2015).

INTRODUCCIÓN

As células nai adultas poden clasificarse en dous grupos segundo teñan unha taxa de renovación alta ou baixa. Nos tecidos con taxas de renovación altas, como o sistema hematopoético, o intestino, a epiderme interfolicular e o folículo piloso, as células nai son responsables de manter a homeostase e tamén de reparar danos despois dunha lesión. Por outra parte, as células nai adultas tamén están presentes en tecidos que presentan unha baixa taxa de renovación, como son o cerebro e o músculo esquelético. No músculo esquelético por exemplo, as células nai están reservadas principalmente para a reparación despois de producirse unha lesión tisular. Sendo polo tanto, as células nai adultas as responsables de manter tanto a homeostase tisular como a rexeneración celular tras producirse un dano (Hsu, Y.-C. and Fuchs, E., 2012).

En moitos tecidos, as células nai adultas atópanse nun estado indiferenciado e de non proliferación ou arresto do ciclo celular reversible que se coñece como quiescencia ou G_0 durante longos períodos de tempo. A función clave do estado quiescente é preservar as propiedades das células nai previndo a diferenciación precoz, e polo tanto manter un conxunto de células nai adultas indiferenciadas. Estas células quiescentes son activadas tras a iniciación da homeostase tisular ou dano nun tecido, conducindo á produción de proxenitores intermedios tamén denominadas células amplificadoras de transición (TA, *Transit-Amplifying*), que á súa vez se diferencian en células maduras funcionais que son capaces de rexenerar o tecido. Unha pequena poboación de proxenitores intermedios sae do ciclo celular e volta entrar en estado de quiescencia para manter unha reserva de células nai adultas quiescentes que poidan responder a futuras demandas (**Figura 5**) (Rumman, M. et al., 2015; Visvader, J.E. and Clevers, H., 2016).

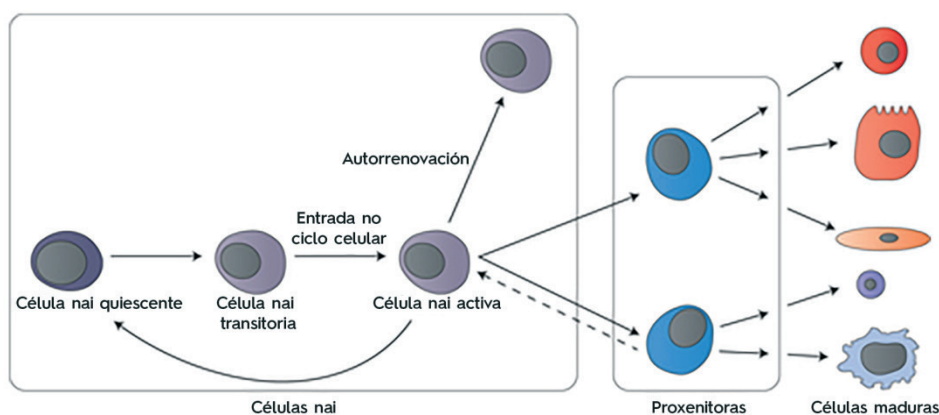


Figura 5. Modelo xeral que representa a organización xerárquica das células nai e proxenitoras específicas de tecido
(Imaxe adaptada de Visvader, J.E. and Clevers, H., 2016).

A nivel molecular, a quiescencia das células nai adultas é regulada a través de mecanismos e factores celulares intrínsecos onde participan a familia das proteínas pocket, Rb (*Retinoblastoma protein*), p107 e p130 e inhibidores de quinasa dependentes de ciclina (CDKIs, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitors*) e extrínsecos, onde o microambiente local, coñecido como nicho xoga un papel moi importante. A interacción dinámica entre as células nai adultas e os seus proxenitores co nicho, que inclúe diferentes tipos celulares como células mesenquimais e estromais, vasos sanguíneos, neuronas e fibras nerviosas, células inmunes e matriz extracelular (ECM, *Extracellular Matrix*), é crítica para unha óptima función das células nai (**Figura 6**). A comunicación entre as células dentro do nicho é mediada a través de factores paracrinos secretados e os seus receptores afíns e interaccións célula-célula ou célula-matriz extracelular, que estimulan vías de sinalización clave nas células nai adultas, particularmente, as vías Wnt, Notch e FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Rezza, A. et al., 2014; Rumman, M. et al., 2015).

De todas formas, a quiescencia non é unha característica requirida das células nai xa que hai células nai que están constantemente dividíndose, podendo chegar a coexistir nun mesmo tecido, poboacións de células nai en estado quiescente e proliferativo (Visvader, J.E. and Clevers, H., 2016).

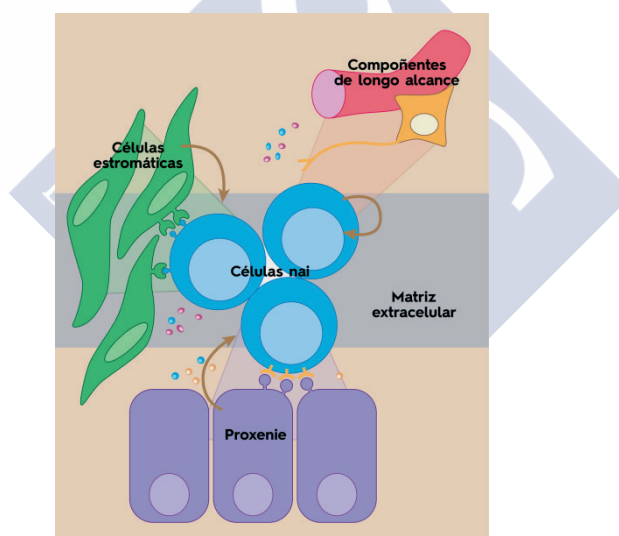


Figura 6. As células nai adultas residen nun microambiente específico denominado nicho, que está composto por múltiples compoñentes (Imaxe adaptada de Rezza, A. et al., 2014).

Como se comentou anteriormente, a capacidade de autorrenovación é unha das características que define ás células nai adultas. Na homeostase tisular, a proliferación das células nai e a diferenciación deben estar perfectamente equilibradas, de tal maneira que tras unha división, en promedio, unha célula filla permanece no compartimento de células nai e a outra diferenciase ben directamente ou a través dunha serie limitada de divisións, á vez que a taxa de proliferación das células nai correspondese coa taxa de perda das células diferenciadas tras a morte celular.

INTRODUCCIÓN

Non obstante, tras un dano tisular, as células nai deben rapidamente producir un exceso de células proliferantes capaces de rexenerar o tecido perdido (Krieger, T. and Simons, B.D., 2015; Simons, B.D. and Clevers, H., 2011; Wabik, A. and Jones, P.H., 2015).

Durante a homeostase tisular, os mecanismos que permiten a autorrenovación das células nai adultas poden agrupase en catro clases dependendo de se o balance entre proliferación de células nai e xeración de células diferenciadas se produce a nivel dunha única célula nai ou a nivel de poboación de células nai e se o destino da célula nai é regulado intrinsecamente ou se se basea nas sinais extrínsecas asociadas co microambiente ou nicho (**Figura 7**). Diferentes estudos que se basearon en experimentos de liñaxe de trazado e en imaxes *in vivo*, revelaron que a autorrenovación a nivel de poboación emerxeu como o mecanismo predominante en tecidos cunha alta taxa de renovación (Krieger, T. and Simons, B.D., 2015; Simons, B.D. and Clevers, H., 2011; Wabik, A. and Jones, P.H., 2015).

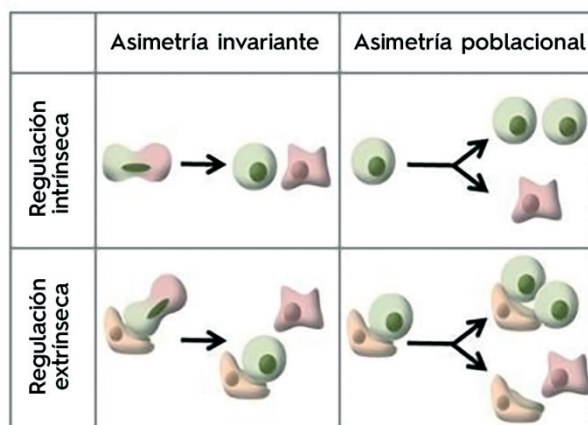


Figura 7. Estratexias de autorrenovación das células nai adultas durante a homeostase tisular
(Imaxe adaptada de Krieger, T. and Simons, B.D., 2015).

Ademais do rol das células nai adultas no mantemento da homeostase tisular e a rexeneración de tecidos tras un dano, ao longo destes anos, moitos estudos mostraron que as células nai adultas tamén teñen un papel en dous procesos biolóxicos significativos: no proceso inevitable do avellentamento e nun dos problemas máis importantes de saúde, cuxa incidencia aumenta coa idade, o cancro. En capítulos posteriores abordaremos en detalle ambas cuestións (Bell, D.R. and Van Zant, G., 2004).

4. REPROGRAMACIÓN CELULAR

4.1. Reprogramación celular

A primeira evidencia de que as células somáticas poden ser reprogramadas a un estado pluripotente procede dos experimentos de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*) realizados en 1962, nos cales

o núcleo dunha célula diferenciada se introduciu nun oocito enucleado da especie *Xenopus laevis*, dando lugar a unha célula, que despois da estimulación, foi capaz de dar lugar a un organismo (Gurdon, J.B., 1962). Posteriormente, Ian Wilmut, realizou un experimento similar, pero neste caso en mamíferos, dando lugar a Dolly, a primeira ovella clonada a partir dunha célula somática adulta (Wilmut, I. et al., 1997).

A posibilidade de reverter a potencia de núcleos somáticos foi confirmada tamén pola fusión con ESCs (Cowan, C.A. et al., 2005 ; Tada, M. et al., 2001), suxerindo que tanto os oocitos sen fertilizar como as ESCs conteñen factores que son capaces de reprogramar as células somáticas. Máis tarde, en 2006, Takahashi e Yamanaka, identificaron catro xenes, Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc (OSKM) (Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006) que cando se sobreexpresan de maneira ectópica, son suficientes para inducir a reprogramación de fibroblastos adultos de pel de rato en células pluripotentes chamadas células nai pluripotentes inducidas (iPSCs). Ao ano seguinte, empregando estes mesmos 4 factores, tamén se xeraron iPSCs a partir de fibroblastos humanos (**Figura 8**) (Takahashi, K. et al., 2007; Yu, J. et al., 2007).

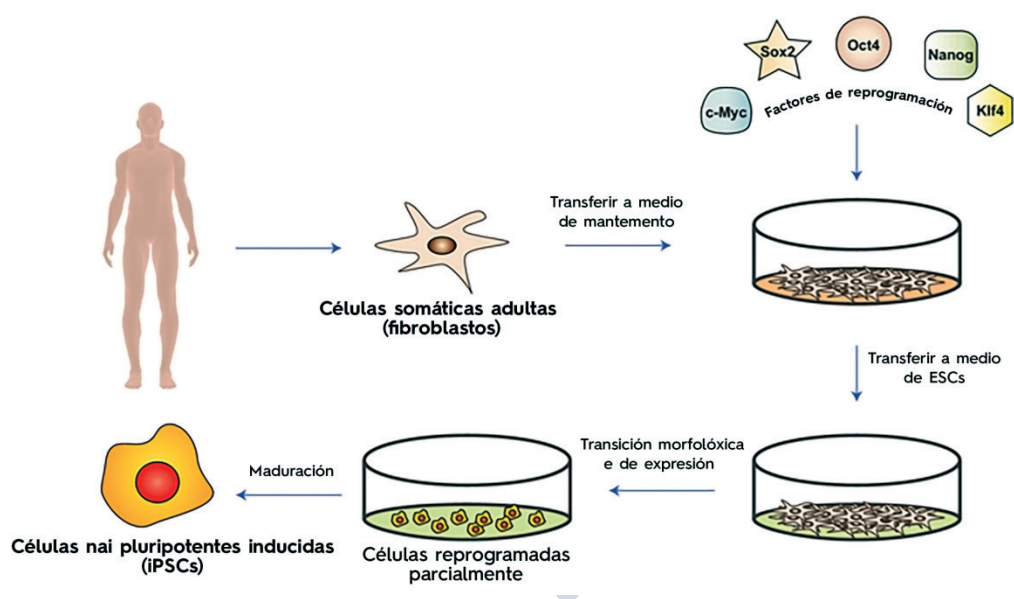


Figura 8. Reprogramación de células somáticas adultas en iPSCs a través da expresión ectópica dos factores de reprogramación
(Imaxe adaptada de Rony, I.K. et al., 2015).

As iPSCs de rato comparten características cas mESCs, como a autorrenovación ilimitada, a morfoloxía, a expresión de factores de transcrición asociados a pluripotencia, a capacidade para formar corpos embrioides e teratomas, a contribución á liña xermlinal dos ratos quiméricos obtidos, e a xeración de ratos por complementación tetraploide (Kang, L. et al., 2009; Maherali, N. et al., 2007; Wernig, M. et al., 2007; Zhao, X. et al., 2009).

INTRODUCCIÓN

Similar ás iPSCs de rato, as iPSCs humanas, expresan antíxenos de superficie específicos de células nai embrionarias humanas (hESCs, *Human Embryonic Stem Cells*) como SSEA-3 e -4 (*Stage Specific Embryonic Antigen 3 and 4*), factores de transcripción asociados a pluripotencia, e teñen a capacidade de diferenciarse a células das tres capas xerminais mediante a formación de corpos embrioides e teratomas (Lowry, W.E. et al., 2008; Park, I.-H. et al., 2008; Takahashi, K. et al., 2007; Yu, J. et al., 2007).

A partir do 2006, moitos outros grupos realizaron experimentos de reprogramación de varios tipos celulares murinos e humanos, demostrando a simplicidade e reproducibilidade da metodoloxía, que se pode aplicar para reprogramar a maioría das células somáticas. Non obstante, a eficiencia do proceso de reprogramación é moi baixa, pois menos do 1% dos fibroblastos transfectados chegan a ser pluripotentes. Ao longo destes anos, realizáronse diversos estudos que analizaron a rede reguladora de xenes de pluripotencia onde atoparon que factores de reprogramación alternativos, moléculas químicas pequenas e suplementos nutricionais son capaces de incrementar a eficiencia de reprogramación, converter células reprogramadas parcialmente en iPSCs e mellorar a calidade destas (Rony, I.K. et al., 2015).

A introdución dos factores de reprogramación nas células diana é o primeiro paso na indución da pluripotencia. Varios tipos de sistemas de liberación fóronse desenvolvendo durante todos estes anos, entre eles, vectores virais, vectores non virais e métodos de transfección directa (Rony, I.K. et al., 2015). Ademais destes métodos, tamén se desenvolveron modelos animais transxénicos que presentan no seu xenoma un casete poliestróico (OSKM) inducible por tetraciclina e un transactivador dependente de tetraciclina (rtTA). Desta forma, os MEFs procedentes deste animal postos en cultivo reprogramáanse tras a adición de doxíciclina, un análogo da tetraciclina (**Figura 9**) (Abad, M. et al., 2013; Carey, B.W. et al., 2010; Stadtfeld, M. et al., 2010).

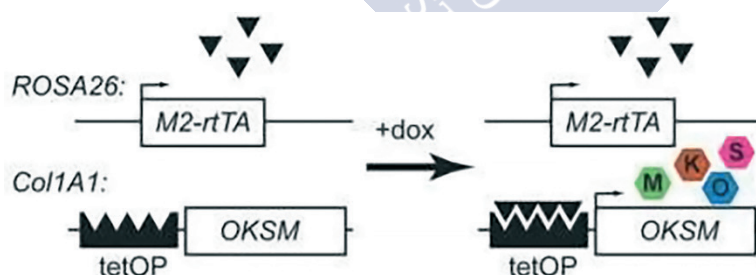


Figura 9. Modelo transxénico reprogramable. Os MEFs obtidos deste rato expresan no locus *Rosa26* un transactivador reverso dependente de tetraciclina (*M2-rtTA*) e un casete poliestróico que codifica para os catro factores de reprogramación (*OSKM*) no locus *Col1A1* baixo o control dun promotor dependente de tetraciclina (*tetOP*). Na presenza de doxíciclina (un análogo da tetraciclina), *M2-rtTA* únese ao *tetOP*, inducendo a expresión dos factores de reprogramación (Stadtfeld, M. et al., 2010).

Os sistemas de reprogramación e toda a información mencionada até o momento correspondese á reprogramación celular baixo condicións controladas de cultivo *in vitro*. A pesar de que nun principio o microambiente tisular *in vivo*, é favorable á diferenciación celular e oposto á reprogramación, ao longo destes últimos anos houbo varios exemplos en ratos nos cales o estado de diferenciación celular normalmente irreversible foi alterado, inducendo conversións directas *in vivo* dun tipo celular a outro diferente. Baseándose nestes precedentes, no ano 2013, Manuel Serrano e colaboradores (Abad, M. et al., 2013) conseguiron a reprogramación *in vivo* empregando un modelo transxénico reprogramable. Os seus experimentos demostran que a indución dos catro factores de reprogramación resulta na formación de teratomas en múltiples órganos, e que as iPSCs circulantes detectadas no torrente sanguíneo do rato reprogramable inducido presentan características de totipotencia (capacidade de formar tanto estruturas embrionarias como extraembrionarias), característica ausente tanto nas ESCs como nas iPSCs xeradas *in vitro*.

4.2. Barreiras do proceso de reprogramación celular

Como comentamos anteriormente, aínda que o proceso de reprogramación celular é reproducíble, o proceso é lento (arredor de dúas semanas) e ineficiente, xa que só unha pequena porción de células transfectadas chegan a converterse en iPSCs (Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006), indicando que as células somáticas deben superar barreiras para reverter ao estado de pluripotencia.

Varios estudos publicados simultaneamente foron quen de elucidar cales eran as principais barreiras do proceso de reprogramación celular. Estes estudos mostraron que a inhibición de p53 e dalgún dos seus xenes diana, como p21, causa un incremento significativo na eficiencia de reprogramación. A vía de p53 é activada tras a expresión dos factores de reprogramación OSKM de Yamanaka, como se mostra claramente polo aumento dos niveis de p53 e xenes diana deste, e pola indución do arresto proliferativo e apoptose mediado por p53 (Hong, H. et al., 2009; Kawamura, T. et al., 2009; Marion, R.M. et al., 2009; Menendez, S. et al., 2010) (**Figura 10**). Esta resposta é independente da integración retroviral (Hong, H. et al., 2009) e podería ser desencadeada por estrés oncoxénico, o cal é un forte mediador da activación de p53. c-Myc (un dos factores do cóctel de reprogramación de Yamanaka), por exemplo, é un oncoxene que, cando está elevado, desencadea a activación de p53 vía p19^{Arf}. Acorde con isto, p19^{Arf} é inducido despois da introdución dos factores de reprogramación (Kawamura, T. et al., 2009). Non obstante, a reprogramación na ausencia de c-Myc, con só tres factores, tamén activa a resposta de p53, indicando que c-Myc non é a única causa desta activación (Hong, H. et al., 2009; Kawamura, T. et al., 2009). Neste sentido, Klf4, outro membro do cóctel de reprogramación, que tamén foi descrito como un oncoxene, induce a resposta de p53, indicando que a ausencia de c-Myc só non é suficiente para evitar a resposta de p53. De maneira interesante, a introdución de só Sox2 e Oct4, os factores de reprogramación restantes, tamén conduce á activación da resposta de p53 e induce o incremento de p21 (Kawamura, T. et al., 2009). Non queda claro

INTRODUCCIÓN

nesta etapa, se isto é debido a unha activación directa da vía de p53 por Sox2 e ou Oct4 ou se a activación de p53 é desencadeada mediante un mecanismo indirecto inherente ao propio proceso de reprogramación.

Por outra parte, outros estudos mostraron que as células deficientes en telomerasa acumulan dano no DNA durante a reprogramación e polo tanto non poden ser reprogramadas en presenza de p53 funcional (Marion, R.M. et al., 2009). Non obstante, as células deficientes en telomerasa poden ser reprogramadas en ausencia de p53 xa que non son eliminadas debido á acumulación de dano no DNA que acontece durante a súa reprogramación (Marion, R.M. et al., 2009). De maneira importante, as células con telomerasa e p53 funcional tamén acumulan certo grao de dano no DNA durante a reprogramación, o cal activa a vía de p53 e limita a súa eficiencia de reprogramación (Menendez, S. et al., 2010)(**Figura 10**). Acorde con isto, as células que están expostas a axentes que danan o DNA, como a luz ultravioleta (UV) ou a vías de resposta a dano no DNA deficientes, tamén activan a vía de p53 o que resulta en eficiencias de reprogramación máis baixas (Marion, R.M. et al., 2009). Estes datos mostran que p53 é activado durante a reprogramación para eliminar as células que presentan dano no DNA acumulado e evitar as aberracións xenómicas. Este é o caso para o dano preexistente, pero se o dano tamén se acumula durante o proceso de reprogramación en si mesmo e provoca a activación de p53 non está totalmente establecido. Non obstante, os conxuntos de datos discutidos anteriormente suxiren que o proceso de reprogramación provoca certo grao de aberracións xenómicas (Banito, A. et al., 2009; Marion, R.M. et al., 2009). Isto faise evidente en células deficientes para p53, as cales parecen acumular máis dano no DNA (máis acumulación de focos positivos para P- γ H2AX e 53BP1, e de P-ATM) que as células wt (*wild type*) durante a reprogramación, presumiblemente debido a un fracaso na eliminación de células danadas (Marion, R.M. et al., 2009). Polo tanto, podemos concluír que a vía de p53 constitúe unha das principais barreiras durante o proceso de reprogramación celular.

Unha barreira adicional que limita a eficiencia de reprogramación é o locus *Ink4a/Arf*. Este locus codifica dous supresores tumorais importantes, p16^{Ink4a} e p19^{Arf} e integra dúas vías antitumorais principais, a vía de p53, mediante a interacción de p19^{Arf} coa proteína inhibidora de p53, Mdm2, e a vía de pRb, mediante a inhibición das quinasas dependentes de ciclina D, CDK4 e CDK6, por p15^{Ink4b} e p16^{Ink4a} (Li, H. et al., 2009). Este locus está silenciado durante o proceso de reprogramación preferentemente nas poboacións de células que se someterán a unha reprogramación exitosa (Banito, A. et al., 2009; Li, H. et al., 2009). O silenciamento do locus polos factores de reprogramación en células nas cales as vías de pRb e p53 non son funcionais demostra que o efecto do proceso de reprogramación na súa inactivación é directo (Banito, A. et al., 2009; Li, H. et al., 2009); non obstante, os mecanismos precisos que desencadean este silenciamento non están claros. En liña con estas observacións, as células deficientes para o locus *Ink4a/Arf*, teñen unha eficiencia de reprogramación máis alta que os seus equivalentes wt (Banito, A. et al., 2009; Li, H. et al., 2009; Utikal, J. et al., 2009). De maneira interesante, o *knockdown* (KD) de p16^{Ink4a} tamén incrementa a eficiencia de reprogramación

suxerindo que ademais da vía p53, a activación da vía do supresor tumoral pRB pode ser unha barreira para a reprogramación (Banito, A. et al., 2009; Li, H. et al., 2009), aínda que se precisarían máis estudos para comprender esta posibilidade. A consecuencia final da barreira imposta polo locus *Ink4a/Arf* na reprogramación é que as células de pase máis tardío presentan eficiencias de reprogramación máis baixas xa que elas teñen niveis máis altos das proteínas p16^{Ink4a}, p19^{Arf} e p21^{cip} que as células de pase máis baixo (Li, H. et al., 2009; Utikal, J. et al., 2009) (**Figura 10**). Acorde con isto, a senescencia constitúe outra das principais barreiras para a reprogramación e a inhibición desta incrementa a eficiencia de reprogramación (Banito, A. et al., 2009).

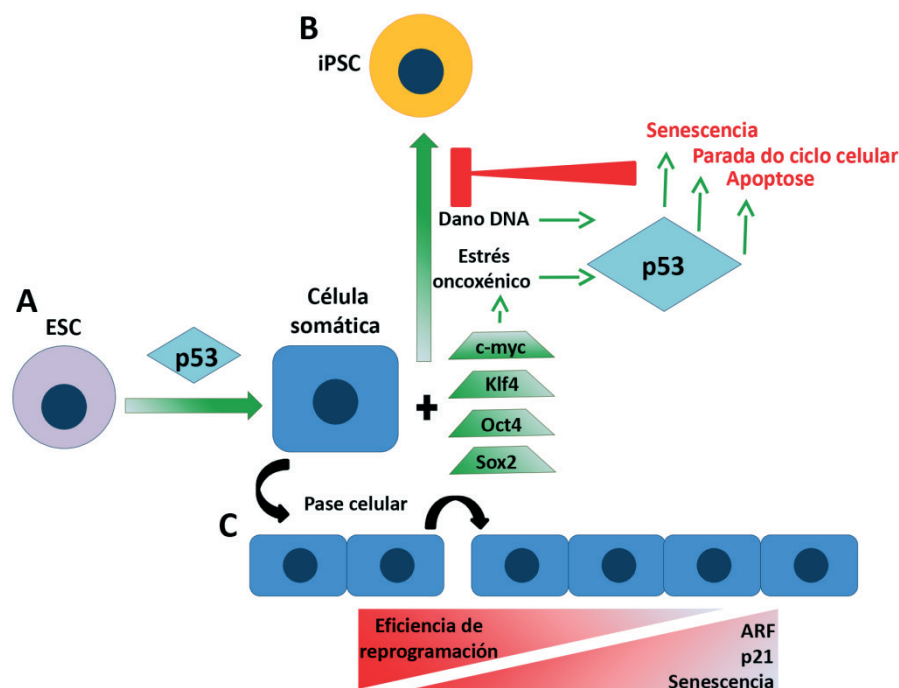


Figura 10. Papel de p53 durante a diferenciación e o proceso de reprogramación celular. **A**, a vía de p53 xoga un papel activo durante o desenvolvemento e diferenciación, efectuando positivamente a diferenciación das células ESCs a certos tipos celulares. **B**, non obstante, o proceso de reprogramación é inhibido por p53. A introdución dos factores de reprogramación de Yamanaka (OSKM) e o dano no DNA inducido durante a reprogramación conduce a activación de p53 que resulta no arresto do ciclo celular, apoptose e senescencia, o que implica unha diminución da eficiencia de reprogramación. **C**, o aumento de pases das células somáticas antes da reprogramación reduce a eficiencia de reprogramación xa que conduce á senescencia e a un incremento dos niveis de p21^{cip} e p19^{Arf}, que promoven o arresto do ciclo celular e a activación de p53, respectivamente (Imaxe adaptada de Menendez, S. et al., 2010).

A adquisición da pluripotencia durante a reprogramación tamén está acompañada pola remodelación epixenética das células somáticas necesaria para establecer a pegada transcripcional e epixenética que define o estado pluripotente. A identidade das células somáticas mantense e establece mediante mecanismos epixenéticos, como a metilación do DNA e modificacións de histonas, que representan outra nova barreira para o proceso de reprogramación celular (Apostolou, E. and Hochedlinger, K., 2013). Por exemplo, a inhibición da metilación do DNA por 5'-azacitidina ou a diminución da DNA metiltransferasa 1 (Dnmt1, DNA methyltransferase 1) incrementa a eficiencia de reprogramación (Mikkelsen, T.S. et al., 2008) ao igual que a diminución de certas histona metiltransferasas (HMTs, Histone methyltransferases), como Ehmt1 e Ehmt2 (Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 1 and 2) (Chen, J. et al., 2013).

4.3. Reprogramación celular e transformación oncoxénica

O proceso de reprogramación celular e transformación oncoxénica presentan certas similitudes, compartindo unha serie de mecanismos moleculares e barreiras comúns (Daley, G.Q., 2008; Menendez, S. et al., 2010) (**Figura 11**). En ambos procesos requírese a activación de novos programas de expresión que confiren á célula unha capacidade proliferativa ilimitada (Daley, G.Q., 2008; Krizhanovsky, V. and Lowe, S.W., 2009).

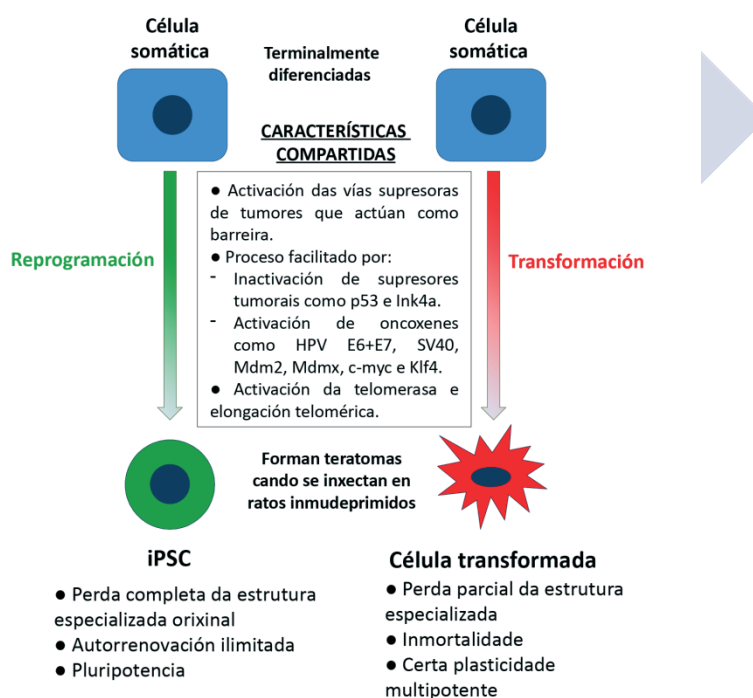


Figura 11. Esquema representativo das similitudes entre o proceso de reprogramación celular e transformación oncoxénica
(Imaxe adaptada de Menendez, S. et al., 2010).

Algúns dos factores de transcripción mencionados anteriormente que se expresan ectópicamente durante a reprogramación celular tamén se atopan sobreexpresados nalgúns tipos de tumores, estando por tanto implicados na oncoxénese (Menendez, S. et al., 2010) (**Figura 11**). c-Myc, por exemplo, é un dos oncoxenes máis coñecidos que está implicado nun rango amplo de tumores humanos. Oct4, xoga un papel importante no inicio de tumores de células xerminais, Sox2 atópase amplificado en carcinoma de célula escamosa (SCC, *Squamous Cell Carcinoma*) de pulmón e esófago e en cancro de pulmón de célula pequena (SCLC, *Small Cell Lung Cancer*). Sox2 tamén é un motor esencial das subpoboacións de células nai do cancro (CSCs, *cancer stem cells*) en glioblastoma, cancro de mama e sarcoma de Ewing. Klf4 xoga un papel dobre en cancro promovendo o desenvolvemento de cancro de mama e pel pero a supresión de cancro gástrico, colorectal e de vexiga. Ademais, destes factores de reprogramación hai outros como Nanog, Lin28 etc., que tamén xogan un papel central en múltiples tumores. De maneira similar, diferentes reguladores de cromatina que xogan un papel esencial como efectores e moduladores durante a reprogramación celular, incluso algúns deles actuando como barreira, tamén teñen funcións establecidas en oncoxénese (Suvà, M.L. et al., 2013) (**Figura 12**).

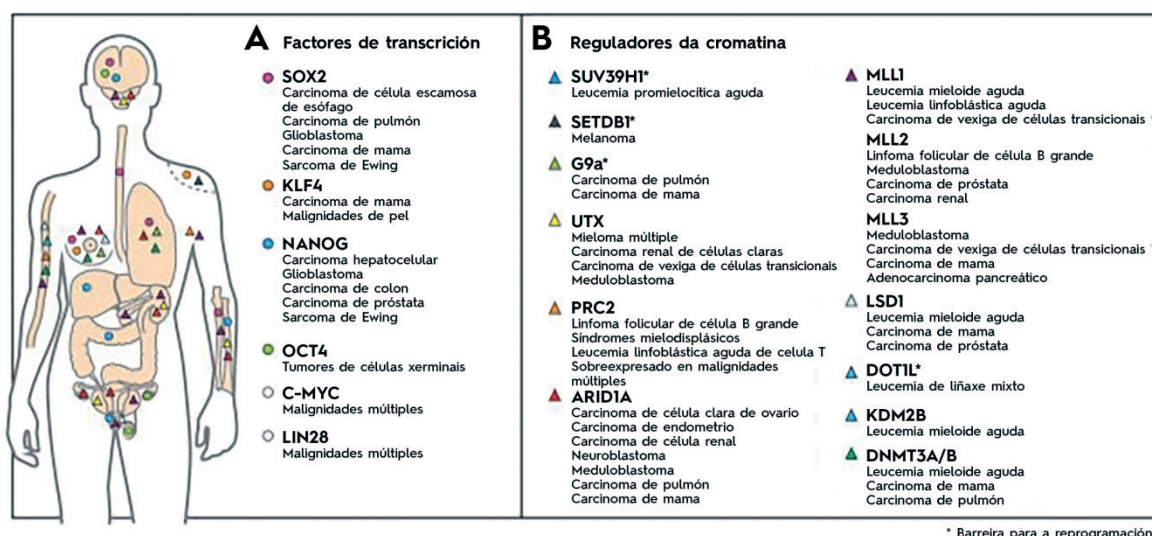


Figura 12. Xenos que participan no proceso de reprogramación celular e transformación oncoxénica. Lista de factores de transcripción (A) e de reguladores de cromatina (B) implicados tanto na reprogramación celular como en cancro onde teñen un papel establecido (Imaxe adaptada de Suvà, M.L. et al., 2013).

Por outra parte, tanto na reprogramación celular como na transformación oncoxénica a activación de vías supresoras de tumores actúa como barreira. Como comentamos anteriormente, a inactivación dalgúns dos xenos supresores de tumores, como *p53* ou o locus *Ink4a/Arf* permite que a eficiencia de reprogramación se incremente e que a transformación se vexa facilitada. A activación da telome-

rasa e a elongación dos telómeros é outra das características compartidas por ambos procesos (Menendez, S. et al., 2010) (**Figura 11**).

5. CÉLULAS NAI E CANCRO

5.1. Concepto de cancro

O cancro defínese como un conxunto de enfermidades causadas pola acumulación de alteracións xenéticas, epixenéticas e transcripcionais que confiren propiedades clave ás células cancerixenas como a proliferación sostida, invasión, metástase, inmortalidade replicativa e anxioxénese así como a capacidade de evadir a supresión do crecemento e a apoptose celular, consideradas colectivamente como as seis características do cancro (**Figura 13**) (Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011). A pesar de xurdir inicialmente dunha única célula mutada, case todos os tumores chegan a ser moi heteroxéneos expresando diferentes marcadores e contendo células proliferativas e máis diferenciadas. A heteroxeneidade tumoral pode ser responsable da progresión do tumor, da metástase, a resistencia a terapia e a recaída (Almendo, V. et al., 2013; De Sousa E Melo, F. et al., 2013).

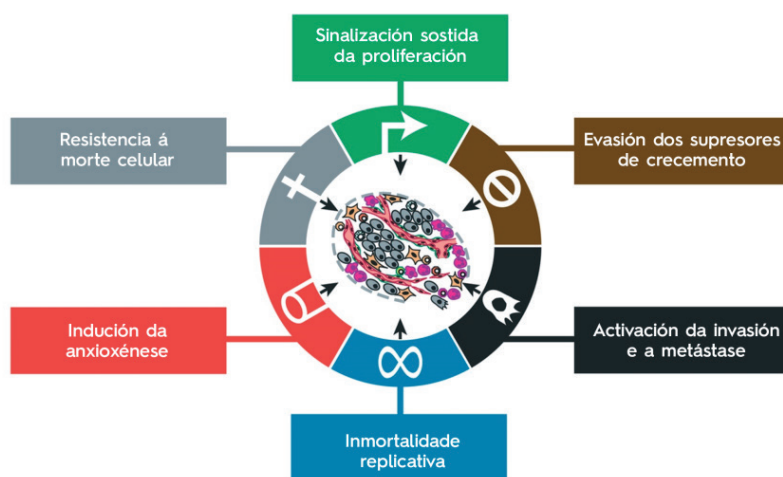


Figura 13. As características do cancro. O esquema enumera as seis características do cancro: sinalización sostida da proliferación, evasión dos supresores de crecemento, activación da invasión e a metástase, inmortalidade replicativa, indución da anxioxénese e resistencia á morte celular (Imaxe adaptada de Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011).

5.1.1. Evasión dos supresores de crecemento

A evasión dos supresores de crecemento é unha das características que presentan as células cancerixenas, xa que ademais de inducir e soste positivamente a acción de sinais estimuladoras do crecemento, as células cancerixenas deben tamén evitar os programas que regulan negativamente a proliferación celular. Moitos destes programas dependen da acción dos xenes supresores de tumores.

Ao longo destes anos descubríronse decenas de supresores tumorais que operan de diferente maneira co obxectivo de limitar a proliferación e o crecemento celular. Mutacións nestes xenes supresores tumorais provocan a inactivación da súa función, o que contribúe ao desenvolvemento de cancro (Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011). Entre os xenes supresores tumorais máis coñecidos destacan a familia retinoblastoma (p107, p130 e pRb), os CDKIs (tales como p15, p16, p18, 19, p21 ou p27) e o “garda do xenoma” p53 (Hannon, G.J. and Beach, D., 1994; Harper, J.W. et al., 1993; Hirai, H. et al., 1995; Levine, A.J. et al., 2004; Tomoda, K. et al., 1999; Vandel, L. et al., 2001; Wang, T.J. et al., 2001). A continuación, descríbese con máis profundidade a dous xenes supresores tumorais prototipo: a Rb, da familia retinoblastoma das proteínas *pocket*, e p53, que ademais de desempeñar un papel como supresores tumorais, tamén están implicados na bioloxía das células nai (Olivos, D.J. and Mayo, L.D., 2016; Sage, J., 2012).

5.1.1.1. Familia retinoblastoma das proteínas *pocket*

A familia retinoblastoma das proteínas *pocket* está formada polas proteínas pRb, p107 e p130 que en humanos están codificadas polos xenes, RB1, RBL1 e RBL2, respectivamente (Ewen, M.E. et al., 1991; Lee, W.H. et al., 1987; Mayol, X. et al., 1993). Os tres membros da familia presentan unha grande homoloxía estrutural e conteñen un dominio conservado denominado “*pocket*”, que interacciona co motivo LXCXE atopado en proteínas virais, e que lle dá o nome a esta familia de proteínas (Dick, F.A., 2007). A proteína Rb comparte aproximadamente o 25 % da súa identidade de secuencia con p107 e p130, mentres que estas comparten entre si o 54% da identidade. Estas similitudes estruturais levaron a identificar funcións moleculares comúns. As tres proteínas regulan negativamente o ciclo celular, e para cada proteína este efecto ligouse á súa capacidade para asociarse con membros da familia dos factores de transcrición E2F e influír na expresión xénica mediada por E2F. Todas as proteínas *pocket* están inactivadas por quinasas dependentes de ciclina (CDKs, *Cyclin-dependent kinases*) e diferentes análises de secuencia suxiren varios residuos comúns de fosforilación (Cobrinik, D., 2005; Dick, F.A. and Rubin, S.M., 2013; Henley, S.A. and Dick, F.A., 2012).

Algunhas investigacións celulares e xenéticas mostraron varias diferenzas funcionais clave entre as proteínas *pocket*. Os ratos *knockout* (KO) para Rb mostran letalidade embrionaria, mentres os ratos KO para os outros dous membros da familia non teñen fenotipo nun fondo xenético mixto (Cobrinik, D. et al., 1996; Jacks, T. et al., 1992; Lee, M.H. et al., 1996). Varios estudos que examinaron a perda de diferentes combinacións de proteínas *pocket* en ratos suxeriron que p107 e p130 teñen un papel solapante no desenvolvemento que é distinto do de Rb (Cobrinik, D. et al., 1996). De maneira importante, o produto xénico do xene RB1 é considerado o membro da familia con actividade supresora tumoral máis relevante, xa que está inactivado nun gran número de cancros humanos (Friend, S.H. et al., 1986; Harbour, J.W. et al., 1988; Horowitz, J.M. et al., 1989; Lee, E.Y. et al., 1988; Medema, R.H. et al., 1995). Ademais, os ratos heterocigotos para Rb desenvolven tumores hipofisarios do lóbulo intermedio e carcinoma medular de tiroide aos 8 e 10 meses

INTRODUCCIÓN

de idade. Os outros dous membros da familia tamén foron implicados no desenvolvemento de cancro, aínda que a súa relevancia é secundaria en comparación a Rb (Vidal, A. et al., 2007). Segundo estas diferenzas xenéticas, as proteínas *pocket* controlan distintos xenes diana E2F e paran as células en diferentes fases do ciclo celular (Hurford, R.K. et al., 1997).

Ademais de presentar un papel importante no control do ciclo celular e no cancro, as proteínas *pocket* tamén desempeñan outras funcións nas células. Por exemplo, os membros da familia p107 e p130 son coñecidos por ter un papel na regulación da diferenciación de células adultas (Indovina, P. et al., 2013). No caso de Rb, esta proteína *pocket* controla a diferenciación celular durante o desenvolvemento embrionario e na liñaxe adulta (Burkhart, D.L. and Sage, J., 2008) e tamén presenta un papel na bioloxía das células nai (Sage, J., 2012). Recentemente, varios grupos investigaron o papel potencial de Rb en células nai e proxenitoras adultas e en ESCs e iPSCs. Con respecto ao papel de Rb en células nai e proxenitoras adultas, varios experimentos indican que a quiescencia das células nai adultas en tecidos e órganos de rato mantense normalmente por Rb, frecuentemente coa axuda do resto dos membros da familia, p107 e p130 (Sage, J., 2012). Este resultado citado anteriormente, xunto ca diminución da proliferación en células nai, como por exemplo nas células nai hematopoéticas, observada en ratos mutantes para a ciclina A e D (Kalaszczyńska, I. et al., 2009; Kozar, K. et al., 2004), mostrou que a familia Rb xoga un papel clave na restrición da expansión das poboacións de células proxenitoras e controla a súa saída do ciclo celular e diferenciación. O fenotipo hiperproliferativo que se atopa en células nai e proxenitoras con Rb ou a vía de Rb inactivada está frecuentemente acompañado pola morte celular e por defectos na diferenciación podendo conducir por último ao desenvolvemento de cancro (Sage, J., 2012).

Por outra parte, pouco se sabe sobre o modo de acción de Rb e os membros da súa familia nas ESCs. Pénsase que Rb e os membros da súa familia están en gran parte inactivados pola hiperfosforilación debido a unha alta actividade ciclina/CDK en ESCs de rato e humanas, permitindo que estas células se autorrenoven e expandan. Cando as ESCs son inducidas a diferenciarse, podería ser que unha actividade CDK reducida conduza a un incremento da actividade Rb, que á súa vez promove a saída do ciclo celular e a diferenciación. Tamén é posible que cambios na actividade Rb e E2F en resposta ao estrés controle a capacidade das ESCs a sufrir morte celular. Ademais, hai evidencias recentes que suxiren que a actividade Rb diminúe gradualmente durante a reprogramación de células diferenciadas a iPSCs, células desdiferenciadas que adquiren a capacidade de proliferar indefinidamente (Li, F. et al., 2010; Samavarchi-Tehrani, P. et al., 2010). De todas formas, precísanse realizar máis experimentos para pescudar en profundidade os mecanismos de acción de Rb e os membros da súa familia en ESCs e reprogramación.

5.1.1.2. p53

O factor de transcrición p53 é un membro da familia p53, xunto con p63 e p73 (Yang, A. et al., 2002). O xene TP53 situado en humanos no cromosoma 17 e que contén 11 exóns e 10 intróns (Lamb, P. and Crawford, L., 1986) codifica para a

proteína supresora tumoral p53 de aproximadamente 53 Kilodaltons (kDa) e que contén 393 aminoácidos (Levine, A.J., 1997). A actividade máis prominente de p53 é a súa función como supresor tumoral. Esta proteína é coñecida como o “garda do xenoma”, polo que p53 induce arresto ciclo celular, apoptose, autofaxia ou senescencia en resposta a diversos estreses, como dano no DNA, sinais hiperproliferativas, hipoxia, estrés oxidativo, esgotamento de ribonucleótidos e falta de nutrientes (Giaccia, A.J. and Kastan, M.B., 1998; Hu, W. et al., 2012). En resposta a tales sinais de estrés, p53 desprázase dos seus reguladores negativos MDM2 e MDM4, permitindo así a súa estabilización e activación. Moitos dos estreses anteriormente mencionados poden atoparse en células tumorais incipientes no microambiente tumoral e son polo tanto probablemente relevantes para a función de p53 na supresión tumoral *in vivo*. Mentres numerosos estudos asociaron a apoptose e o arresto do ciclo celular mediado por p53 coa supresión tumoral, p53 tamén desempeña un papel importante regulando outros procesos celulares, como o metabolismo celular, o mantemento de células nai, a invasión e metástase, así ben como a comunicación célula-célula dentro do microambiente tumoral, que tamén poden contribuír á supresión tumoral (Bieging, K.T. et al., 2014; Vousden, K.H. and Prives, C., 2009).

A importancia de p53 na supresión tumoral é inequívoca, como demostra a súa inactivación en máis da metade de todos os cancros humanos esporádicos, a susceptibilidade a cancro dos individuos co síndrome Li-Fraumeni que herdán un alelo TP53 mutante, e a predisposición tumoral espontánea dos ratos deficientes en *Trp53* (Brady, C.A. and Attardi, L.D., 2010; Vousden, K.H. and Prives, C., 2009). Durante o desenvolvemento tumoral, unha mutación en TP53, xa sexa esporádica ou herdada, é tipicamente seguida pola perda de heterocigosidade, o que resulta na deficiencia completa de p53. A deficiencia de p53 pode mellorar a iniciación ou progresión de cancro, dependendo do tipo de tumor, e os tumores que perden p53 caracterízanse comunmente por presentar máis características malignas, como a perda de diferenciación celular, inestabilidade xenética e maior invasividade e potencial metastásico. Estes efectos son probablemente conferidos tanto pola perda da función de p53 wt como polas propiedades oncoxénicas de ganancia de función que caracterizan a algúns mutantes de p53 (Fearon, E.R. and Vogelstein, B., 1990; Lang, G.A. et al., 2004; Malkin, D. et al., 1990; Miller, L.D. et al., 2005; Mizuno, H. et al., 2010; Olivier, M. and Taniere, P., 2011; Rivlin, N. et al., 2011; Song, H. et al., 2007).

Como “garda do xenoma”, p53 tamén é coñecido por xogar papeis clave no mantemento da estabilidade xenómica das ESCs afectando á diferenciación ou á apoptose das mesmas (Li, M. and Huang, J., 2010; Lin, T. et al., 2005). Por exemplo, tras dano no DNA, p53 induce a diferenciación das mESCs reprimindo a transcripción de Nanog, o que explica que p53 desempeña unha función na regulación da diferenciación nas mESCs (Lin, T. et al., 2005). Ademais de regular a diferenciación das ESCs, p53 tamén xoga un papel inhibitorio na xeración de iPSCs. O bloqueo da sinalización de dano no DNA mediada por p53 incrementa dramaticamente a eficiencia de reprogramación (Kawamura, T. et al., 2009; Marión, R.M. et al., 2009).

Recentemente, Jing Huang e colaboradores (Li, M. et al., 2012) describiron a rede transcricional mediada por p53 en mESCs e proporcionan as bases moleculares para entender os papeis de p53 na regulación da diferenciación das ESCs tras dano no DNA. Os seus experimentos revelan que a unión de p53 ás rexións promotoras correlaciona de maneira significativa coa activación xénica pero non coa represión. Tamén viron que a represión mediada por p53 é a través da interferencia coa actividade dos *enhancers* distais. De maneira importante, p53 reprime moitos dos xenes que codifican para reguladores transcricionais clave nas mESCs, tales como Oct4, Nanog, Sox2, c-Myc, etc. Outros experimentos mostraron que os xenes reprimidos por p53 están funcionalmente asociados co estado de ESCs ou iPSCs mentres os xenes activados por p53 están ligados á diferenciación. Tras dano no DNA, viuse que p53 afecta negativamente á autorrenovación e pluripotencia das ESCs. En conxunto, os seus resultados apoian un modelo no que, en resposta ao dano no DNA, p53 afecta ao estado das ESCs a través da activación de xenes asociados a diferenciación e reprime os xenes enriquecidos nas ESCs.

5.2. Células nai e cancro

5.2.1. Similitudes entre as células nai e as células tumorais

As células nai e as células tumorais comparten unha serie de características que xeraron un grande interese nos posibles vínculos entre estas dúas clases de células. As dúas características principais distintivas das células nai como son a autorrenovación e o potencial ou capacidade de diferenciación, están reflectidas na alta capacidade proliferativa e plasticidade fenotípica que presentan as células tumorais (Reya, T. et al., 2001).

Dado que as células nai e as células cancerixenas comparten a capacidade de autorrenovarse, parece razoable propoñer que as células tumorais se apropian da maquinaria de autorrenovación que está normalmente expresada nas células nai. Varias evidencias mostran que moitas das vías que están classicamente asociadas co cancro poden tamén regular o desenvolvemento das células nai. Por exemplo, a prevención da apoptose pola expresión forzada do oncoxene *bcl-2* resulta nun incremento do número das HSCs *in vivo*, suxerindo que a morte celular ten un papel na regulación da homeostase das HSCs (Domen, J. et al., 1998; Domen, J. and Weissman, I.L., 2000). Outras vías de sinalización asociadas coa oncoxénese, tales como as vías de sinalización de Notch, Sonic hedgehog (Shh) e Wnt poden regular tamén a autorrenovación das células nai (Taipale, J. and Beachy, P.A., 2001). Por outro lado, ademais dun gran potencial proliferativo, as células nai e as células tumorais teñen a capacidade de dar lugar a novos tecidos normais ou anormais, respectivamente, que están compostos por combinacións heteroxéneas de células con diferentes características fenotípicas e que exhiben varios graos de diferenciación (Reya, T. et al., 2001).

5.2.2. As células nai como unha posible orixe das CSCs

As similitudes mencionadas anteriormente entre as células nai e células tumorais deron lugar á hipótese de que os tumores derivan frecuentemente de células proxenitoras ou células nai non diferenciadas ou, alternativamente, que as células cancerixenas poden sufrir unha desdiferenciación progresiva durante o seu desenvolvemento (Beachy, P.A. et al., 2004; Reya, T. et al., 2001; Stingl, J. and Caldas, C., 2007). Ademais, estes paralelismos entre ambos tipos celulares, dou lugar a que algúns autores propuxeran que as CSCs, tamén coñecidas como, células iniciadoras de tumores (TICs, *Tumor Initiating Cells*) deriven das células nai (Greenow, K. and Clarke, A.R., 2012; Lobo, N.A. et al., 2007; Reya, T. et al., 2001). As CSCs, que se definen como a fracción de células dentro dun tumor que posúen o potencial para proliferar indefinidamente e que poden xerar todas as liñaxes heteroxéneas do tumor orixinal en modelos xenográficos, sustentan a un dos dous modelos que explican a heteroxeneidade dos tumores, o modelo das CSCs. Este modelo suxire que os tumores mostran unha xerarquía, cunha subpoboación de células tumorais, as CSCs, que posúen un potencial tumorixénico moito maior que o doutras células do cancro e que representan o cumio dunha organización xerárquica similar ao do tecido normal (**Figura 14**) (Greenow, K. and Clarke, A.R., 2012; Sugihara, E. and Saya, H., 2013).

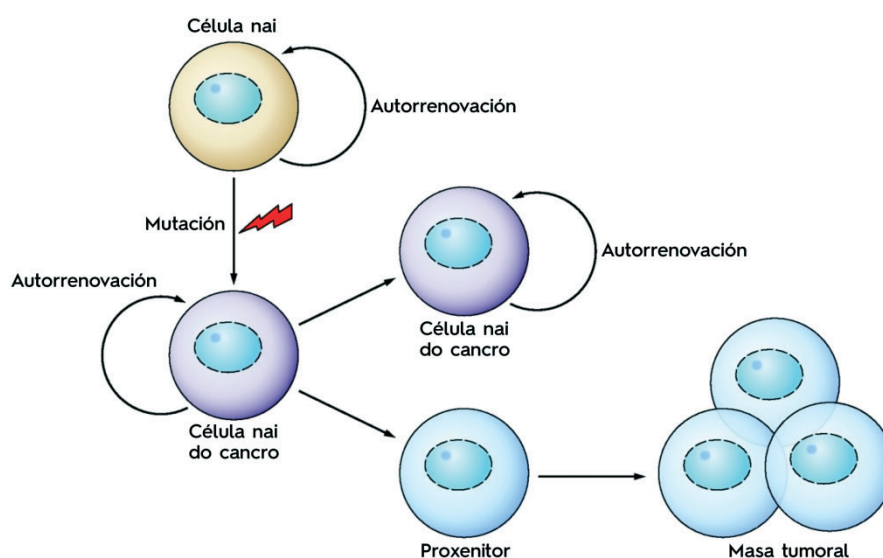


Figura 14. Modelo das CSCs. As células nai do cancro poden orixinarse como resultado das mutacións adquiridas por parte das células nai normais. As células nai do cancro conservan a capacidade de autorrenovarse e a través de múltiples divisións celulares asimétricas son capaces de producir células fillas que forman o corpo da poboación tumoral (Imaxe adaptada de Greenow, K. and Clarke, A.R., 2012).

O feito de que se considere as células nai como unha das posibles orixes das CSCs é porque ademais de que características biolóxicas que presentan as células nai normais, como a capacidade de autorrenovación e de xerar proxenie diferen-

ciada, son similares ás propiedades das CSCs, as células nai viven moito máis tempo en comparación con outras células dentro dos tecidos, polo que teñen máis oportunidades de acumular múltiples mutacións adicionais que poden ser necesarias para aumentar a taxa de proliferación celular e producir cancros clinicamente significativos (**Figura 14**). Así mesmo, observouse que nalgúns tipos de cancro, as CSCs están enriquecidas en subpoboacións celulares que expresan marcadores de células nai (Greenow, K. and Clarke, A.R., 2012; Sugihara, E. and Saya, H., 2013).

5.2.3. Sinatura das ESCs en cancro

Varios estudos mostraron que as ESCs e múltiples tipos de células tumorais humanas comparten patróns de expresión xénica. Un dos primeiros estudos en mostrar isto, foi o realizado por Chang e colaboradores (Wong, D.J. et al., 2008), onde recadaron conxuntos de datos a grande escala que se adquiriron a partir das ESCs e das células nai adultas, e construíron un mapa de módulo xenético. Do mapa de módulo xenético inicial, definíronse dous módulos (conxuntos de xenes) que distinguen as ESCs (o módulo tipo ESCs) e células nai adultas (o módulo de células nai adultas). As actividades destes dous módulos foron probadas empregando un conxunto de datos de expresión xénica de varias mostras tumorais humanas. Este grupo de Chang e colaboradores observou que o módulo tipo ESCs activábase en diversos cancros epiteliais humanos. Ademais, mostraron que c-Myc activa o módulo tipo ESCs en células epiteliais. Tendo en conta estas observacións en conxunto, propuxeron que a activación dun programa transcricional tipo ESCs a través de c-Myc podería inducir as características de CSCs en células adultas diferenciadas. De maneira independente, Weinberg e colaboradores (Ben-Porath, I. et al., 2008) definiron 13 conxuntos de xenes nas ESCs a partir dos conxuntos de datos a grande escala previamente existentes e colocou cada un dos 13 conxuntos de datos nunha das catro categorías: expresados en ESCs, dianas dos factores do núcleo activo (Nanog, Oct4 e Sox2), dianas do complexo proteico represivo do grupo Polycomb (PRC, *Polycomb-group repressive protein complex*) e dianas de c-Myc. Cando estes conxuntos de datos foron testados empregando conxuntos de datos do perfil de expresión de pacientes con cancro, a activación do conxunto de xenes específicos das ESCs (denominados expresados en ESCs) e a represión de xenes diana de PRC estaban de maneira significativa enriquecidos en tumores humanos pouco diferenciados. Unha metodoloxía similar definiu unha sinatura denominada *Consensus Stemness Ranking* (CSR) a partir de catro sinaturas diferentes de células nai e tamén mostrou que a sinatura CSR ten un valor prognóstico en varios tipos de cancro humanos (Shats, I. et al., 2011). En conxunto, todos estes estudos mostran claramente que sinaturas específicas das ESCs son compartidas entre varios cancros humanos e modelos de cancro animal.

6. CÉLULAS NAI E AVELLEMENTAMENTO

6.1. Concepto de avellementamento

O avellementamento é un proceso complexo e prexudicial experimentado pola maioría dos organismos vivos que se caracteriza pola perda progresiva da integridade fisiolóxica, o que conduce a unha función deteriorada e unha maior vulnerabilidade á morte. Este deterioro é o primeiro factor de risco para as principais patoloxías humanas, como o cancro, diabeite ou enfermidades cardiovasculares e neurodexenerativas. Na revisión de López-Otín, C. et al., 2013, os autores identifican e clasifican as características celulares e moleculares do avellementamento. En concreto, propoñen nove características candidatas (inestabilidade xenómica, acoutamento dos telómeros, alteracións epixenéticas, perda da proteostase, detección de nutrientes desregulada, disfunción mitocondrial, senescencia celular, esgotamento de células nai e comunicación intercelular alterada) que son xeralmente consideradas por contribuír ao proceso de avellementamento e xuntas determinar o fenotipo de avellementamento en diferentes organismos (**Figura 15**).



Figura 15. As características do avellementamento. O esquema enumera as nove características do avellementamento: inestabilidade xenómica, acoutamento dos telómeros, alteracións epixenéticas, perda da proteostase, detección de nutrientes desregulada, disfunción mitocondrial, senescencia celular, esgotamento de células nai e comunicación intercelular alterada (Imaxe adaptada de López-Otín, C. et al., 2013).

6.2. Esgotamento de células nai e avellentamento

Un dos signos máis obvios do proceso de avellentamento é a diminución da capacidade homeostática e rexenerativa dos diferentes tecidos e órganos do noso corpo (Kirkwood, T.B.L., 2005; Rando, T.A., 2006). Co avance da idade, por exemplo, a cicatrización de feridas é máis lenta na pel, o pelo tórnase gris ou pérdese, a masa e a forza do músculo esquelético é menor, a proporción de constituíntes celulares no sangue está alterada, hai unha diminución na neuroxénese, etc. (Sharpless, N.E. and DePinho, R.A., 2007). Tendo en conta o papel directo que desempeñan as células nai adultas no mantemento da homeostase tisular normal e na capacidade reparadora e rexenerativa de moitos tecidos en resposta a un dano ou lesión, postulouse que perdas no número ou na funcionalidade das células nai ou mesmo cambios no destino destas, poderían contribuír de maneira significativa ás características fenotípicas do avellentamento (Campisi, J., 2005; Liu, L. and Rando, T.A., 2011). De feito, hai evidencia de que células nai adultas de múltiples tecidos experimentan cambios asociados coa idade, o que frecuentemente conduce ao dano ou alteración da homeostase (Ortells, M.C. and Keyes, W.M., 2014).

Esta diminución funcional asociada á idade nas células nai adultas pode atribuírse amplamente a dous tipos diferentes de causas: a mecanismos celulares intrínsecos ou a mecanismos celulares extrínsecos que afectan ao conxunto de células nai adultas externamente (Liu, L. and Rando, T.A., 2011; Oh, J. et al., 2014; Schultz, M.B. and Sinclair, D.A., 2016). Os mecanismos intrínsecos presentarían cambios no conxunto de células nai adultas como a acumulación de dano no DNA (Rossi, D.J. et al., 2007), alteracións no epixenoma (Li, J. et al., 2012; Liu, L. et al., 2013), disfunción e acoutamento dos telómeros (Flores, I. et al., 2008; Wong, K.-K. et al., 2003) ou senescencia intrínseca (Molofsky, A. V et al., 2006). Non obstante, diversas influencias externas como cambios no ambiente local proporcionado polo nicho das células nai, o contacto directo célula-célula ou alteracións no medio sistémico tamén poden afectar ao compartimento de células nai adultas (Liu, L. and Rando, T.A., 2011; Oh, J. et al., 2014; Schultz, M.B. and Sinclair, D.A., 2016).

6.2.1. Avellentamento das células nai adultas

As células nai adultas están expostas a moitos dos mesmos factores que conducen a cambios relacionados coa idade na súa proxenie replicativa ou postmitótica, pero as células nai deben resistir a eses cambios ca autorrenovación da poboación para asegurar o funcionamento axeitado e a homeostase normal do tecido ao longo da vida (Jones, D.L. and Rando, T.A., 2011; Rando, T.A., 2006; Sharpless, N.E. and DePinho, R.A., 2007). Como unha poboación replicativa que pode presentar períodos prolongados de quiescencia (**Figura 16**), as células nai deben posuír mecanismos de defensa e reparación que son relevantes tanto para as células altamente proliferativas como para as células postmitóticas de vida longa (Rando, T.A., 2006).

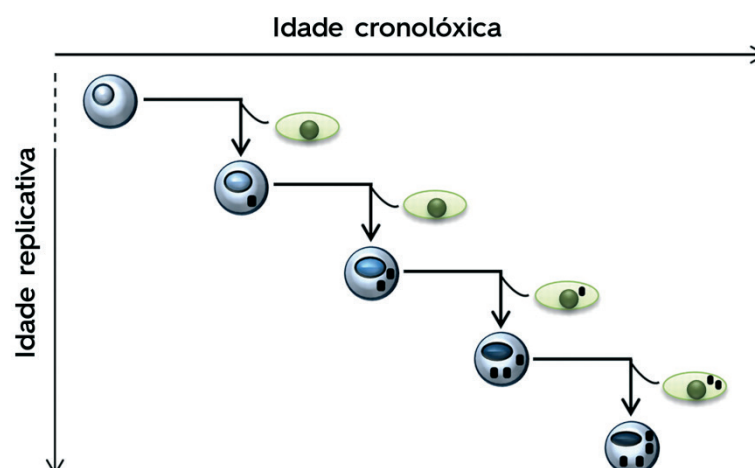


Figura 16. Idade cronolóxica e replicativa das células nai. Durante períodos prolongados de quiescencia e polo proceso de autorrenovación para establecer un continuo celular, as células nai experimentan o avellentamento cronolóxico causado pola acumulación de moléculas intracelulares danadas ou aberrantes. Durante o proceso de división celular asimétrica e autorrenovación, as células nai tamén experimentan o avellentamento replicativo, o cal é particularmente importante nos tecidos con taxas altas de renovación (Imaxe adaptada de Liu, L. and Rando, T.A., 2011).

Nos animais lonxevos, as células nai adultas, particularmente aquelas que están continuamente renovándose nos tecidos, experimentan moitas roldas de división celular para manter a homeostase tisular do tecido (Fuchs, E. et al., 2001; van der Flier, L.G. and Clevers, H., 2009). Durante cada rolda de replicación do DNA, os procesos que sustentan ao avellentamento replicativo, como o acoutamento dos telómeros, reordenacións cromosómicas e mutacións dunha única base (Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A., 2005), poden acontecer e finalmente conducir a senescencia celular (Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F., 2007; Hayflick, L., 1965). As manipulacións experimentais, como o transplante en serie, poñen claramente de manifesto que as células nai adultas teñen unha vida replicativa finita que pode esgotarse (Siminovitch, L. et al., 1964; Waterstrat, A. and Van Zant, G., 2009). Non obstante, como os experimentos de transplante en serie someten ás células nai a excesivas roldas de división celular, fica por determinar se o avellentamento replicativo só é suficiente para contribuír á diminución da función das células nai nos mamíferos lonxevos durante o avellentamento normal.

As células nai adultas tamén son susceptibles aos tipos de cambios relacionados coa idade, chamado avellentamento cronolóxico, que acontece en células que non se dividen como son as neuronas e os cardiomiocitos (Busuttil, R. et al., 2007). Estes cambios inclúen a acumulación de macromoléculas danadas, como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, algúns dos cales poden, de feito, agregarse e formar complexos estables e de vida longa que son tóxicos para a célula (Koga, H. et al., 2011; Rajawat, Y.S. et al., 2009). As células nai adultas presentan períodos prolon-

gados de quiescencia na maioría dos tecidos de mamíferos (Li, L. and Clevers, H., 2010). As macromoléculas danadas poden acumularse nas células nai durante este tempo, ao igual que nas células postmitóticas de vida longa. As macromoléculas específicas ou os agregados macromoleculares poden incluso reterse selectivamente nas células nai a medida que se someten ao proceso de autorrenovación por división celular asimétrica (Conboy, M.J. et al., 2007; Knoblich, J.A., 2008). Neste senso, a autorrenovación da proxenie representa unha especie de continuo celular e só incrementa o risco de que as células nai adultas poidan sufrir os efectos do avellentamento cronolóxico.

6.2.2. Manifestacións funcionais do avellentamento das células nai adultas

O avellentamento nas células nai adultas causa cambios no destino ou funcionalidade da proxenie de células nai adultas. Nalgúns casos, como nas células nai neurais (NSCs, *neural stem cells*) e células nai melanocíticas (Inomata, K. et al., 2009; Maslov, A.Y. et al., 2004), estes cambios poden conducir á redución do grupo de células nai adultas (**Figura 17**) (Kuhn, H. et al., 1996; Maslov, A.Y. et al., 2004). Non obstante, na maioría de compartimentos de células nai, o número de células nai non diminúe de maneira significativa coa idade (Booth, C. and Potten, C.S., 2000; Brack, A.S. and Rando, T.A., 2007; Giangreco, A. et al., 2008), senón que estas células nai experimentan un cambio no destino celular coa idade (Liu, L. and Rando, T.A., 2011).

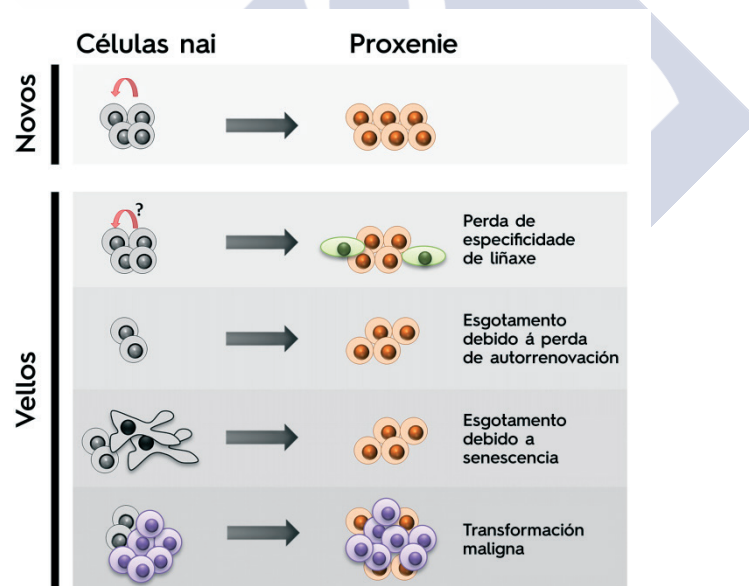


Figura 17. Diminución na función das células nai adultas coa idade. Nos animais novos, as células nai divídense asimetricamente para autorrenovarse e dar lugar unha proxenie diferenciada específica de liñaxe durante a homeostase ou rexeneración tisular. Coa idade, algunhas células nai perden a súa especificidade de liñaxe e dan lugar a proxenie non funcional, que resulta na perda da integridade do tecido e a diminución da función fisiolóxica, aínda que o número de células nai non

se vexa afectado. Algunhas células nai perden a capacidade de autorrenovación, o que resulta nunha división celular simétrica que dá lugar a dúas células fillas diferenciadas e unha redución gradual do conxunto de células nai. A senescencia das células nai pode tamén contribuír a unha perda das células nai funcionais. O aumento de tumores malignos coa idade, particularmente en epitelios con alta taxa de renovación, parecen xurdir de dentro do compartimento de células nai ou de proxenitores temperás (Imaxe adaptada de Liu, L. and Rando, T.A., 2011).

6.2.2.1. Cambios relacionados coa idade no destino da proxenie das células nai adultas

As células nai adultas poden ser unipotentes, bipotentes ou multipotentes, dando lugar a unha diversidade limitada de proxenie segundo o tecido no que residan (Rando, T.A., 2006; Weissman, I.L., 2000). A capacidade das células nai para producir un repertorio apropiado de proxenie específica do tecido é crucial para a homeostase e rexeneración funcional do tecido. A medida en que as células nai adultas e a súa proxenie se comprometen a unha liñaxe en particular é determinada en gran parte polo epixenoma, influíndo en qué xenes se expresarán ou se reprimirán e en último termo moldeando as características fenotípicas das células (Bernstein, B.E. et al., 2006; Hemberger, M. et al., 2009; Mikkelsen, T.S. et al., 2007). A execución do programa epixenómico que influencia no destino da proxenie das células nai é modulada polos factores ambientais e mediada por vías de sinalización que teñen papeis importantes na organoxénese durante o desenvolvemento, incluíndo as vías de Wnt, Notch e Hedgehog (Berger, S.L., 2007; Brack, A.S. et al., 2008; Rittié, L. et al., 2009; van der Flier, L.G. and Clevers, H., 2009). Coa idade, a activación intempestiva destas vías como resultado das sinais do “ambiente avellentado” pode conducir a unha especificación de liñaxe aberrante da proxenie das células nai como foi demostrado en diferentes tecidos tales como, o músculo esquelético, o tendón e o sistema hematopoético (Brack, A.S. et al., 2007; Sudo, K. et al., 2000; Taylor-Jones, J.M. et al., 2002; Zhou, Z. et al., 2010). A acumulación desta proxenie anormal contribúe á deterioración gradual da estrutura e función do tecido asociado co avellentamento (**Figura 17**).

6.2.2.2. Redución dos compartimentos de células nai adultas

Certos tipos de disfuncións relacionadas coa idade das células nai, tales como a perda da capacidade para autorrenovarse e a activación de vías de senescencia, poden conducir á redución do conxunto de células nai (**Figura 17**). Dentro de compartimentos de células nai específicos, tales como as células nai melanocíticas na pel e as células nai neurais no cerebro, unha redución relacionada coa idade no número de células nai parece ser a responsable de fenotipos de avellentamento específicos nestes tecidos (Inomata, K. et al., 2009; Kuhn, H. et al., 1996; Maslov, A.Y. et al., 2004; Nishimura, E.K. et al., 2005; Renault, V.M. et al., 2009). Por exemplo, a redución de células nai melanocíticas nos folículos pilosos e aparición de melanocitos pigmentados maduros no nicho das células nai tanto en ratos como en humanos avellentados (Inomata, K. et al., 2009; Nishimura, E.K. et al., 2005), conduciu a un dos cambios fenotípicos máis visibles durante o avellentamento, a

aparición de canas. Neste caso, parece que o avellentamento e o estrés xenotóxico induce a acumulación de dano no DNA nas células nai melanocíticas o que resulta na perda da autorrenovación das mesmas. Ambas células fillas dunha célula nai melanocítica con niveis altos de dano no DNA tenden a diferenciarse en melanocitos produtores de pigmento, o que resulta nunha redución gradual do conxunto de células nai (Inomata, K. et al., 2009). No caso das NSCs, a redución no número destas células nai tamén está posiblemente relacionado coa perda específica da capacidade de autorrenovación e parece ser responsable da declinación da neuroxénese coa idade (Molofsky, A. V et al., 2006; Nishino, J. et al., 2008; Renault, V.M. et al., 2009).

6.2.2.3. Senescencia das células nai adultas

Un dos destinos potenciais das células nai e a súa proxenie que ten un impacto negativo profundo na homeostase e rexeneración tisular é o estado de senescencia (**Figura 17**). A expresión de marcadores de senescencia, como a actividade β -galactosidasa asociada a senescencia, os focos de HP-1 (*Heterochromatin protein-1*), e p16^{Ink4a} atópanse incrementados coa idade en moitos tecidos de varias especies de mamíferos (Sharpless, N.E. and DePinho, R.A., 2007). Considerado como un biomarcador de avellentamento, p16^{Ink4a} parece contribuír á perda replicativa das células nai (Krishnamurthy, J. et al., 2006; Melzer, D. et al., 2007; Molofsky, A. V et al., 2006). A sobreexpresión de p16^{Ink4a} suprime a función das HSCs e a proliferación das células β pancreáticas en animais novos, asemellándose á diminución funcional observada no avellentamento (Janzen, V. et al., 2006; Krishnamurthy, J. et al., 2006). Da mesma maneira, a eliminación xenética de p16^{Ink4a} atenúa a redución relacionada coa idade na proliferación e función de NSCs, HSCs e células β pancreáticas (Janzen, V. et al., 2006; Molofsky, A. V et al., 2006). Polo tanto, propúxose que poboacións específicas de células nai poden amosar unha diminución relacionada coa idade no número como resultado da senescencia de células nai (Sahin, E. and Depinho, R.A., 2010), a pesar de que hai poucos exemplos nos cales a senescencia das células nai foi demostrada directamente durante o avellentamento normal.

6.2.2.4. Transformación maligna das células nai adultas

Outro destino que foi proposto para as células nai específicas de tecido, que non só afectaría á funcionalidade da poboación senón que tamén tería un impacto dramático na lonxevidade do organismo, é a transformación maligna (**Figura 17**). Que os cancros xurdan dos compartimentos de células nai adultas é un gran desafío por demostrar experimentalmente. Esta cuestión ten particular relevancia no contexto do avellentamento das células nai, xa que a idade é o primeiro factor de risco do cancro (Danaei, G. et al., 2010). A nivel molecular, o cancro desenvólvese a partir dunhas cantas células que albergan mutacións xenómicas e que escapan do estrito control do ciclo celular (Hahn, W.C. and Weinberg, R.A., 2009). De todas formas, queda por mostrar se os precursores celulares do cancro son as células nai específicas de tecido que adquiriron tales mutacións (Gupta, P.B. et al., 2009).

7. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX2

7.1. Características xerais dos factores de transcripción Sox

No ano 1990, descubriuse o xene Sry (*Sex-determining region Y*), a rexión determinante do sexo masculino do cromosoma Y implicada no desenvolvemento dos testículos, que foi o membro fundador da familia de proteínas Sox (Gubbay, J. et al., 1990; Koopman, P. et al., 1991; Sinclair, A.H. et al., 1990). O xene Sry codifica un factor de transcripción cun dominio HMG (*High mobility group*) conservado evolutivamente de 79 aminoácidos, un dominio que foi atopado tamén en todos os euterios e mamíferos marsupiais estudados até o momento (Kashimada, K. and Koopman, P., 2010; Sekido, R. and Lovell-Badge, R., 2013). A identificación e a realización de análises baseados na homoloxía do dominio de unión ao DNA denominado HMG do SRY levou ao descubrimento da familia de factores de transcripción Sox. En vertebrados, esta familia comprende máis de 20 xenes Sox que se orixinaron a través de procesos de duplicación e diverxencia (Bowles, J. et al., 2000; Koopman, P. et al., 1991). Estudos de ganancia ou perda de función dos xenes Sox revelan que estes xenes xogan papeis importantes na homeostase tisular, organoxénese e decisións relacionadas co destino celular en moitos procesos do desenvolvemento de estado embrionario a adulto (Kamachi, Y. et al., 2000; Kamachi, Y. and Kondoh, H., 2013; Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013). Por outra parte, os factores de transcripción Sox tamén están implicados na etiloxía de diferentes enfermidades e certos cancros (Bowles, J. et al., 2000; Dong, C. et al., 2004).

As proteínas Sox únense especificamente a motivos ATTGTT ou secuencias relacionadas a través do seu dominio HMG, que consiste en tres hélices alfa (α) (Badis, G. et al., 2009; Kondoh, H. and Kamachi, Y., 2010). Esta unión establécese pola interacción do dominio HMG co suco menor do DNA, que estende o suco menor e causa que o DNA se incline cara o suco maior (Reményi, A. et al., 2003). Especúlase que esta flexión do DNA en si mesmo podería contribuír a funcións reguladoras das proteínas Sox (Pevny, L.H. and Lovell-Badge, R., 1997), pero isto non se demostrou experimentalmente. As proteínas Sox clasifícanse en grupos da A ao H, segundo a secuencia de aminoácidos do dominio HMG (**Figura 18**).

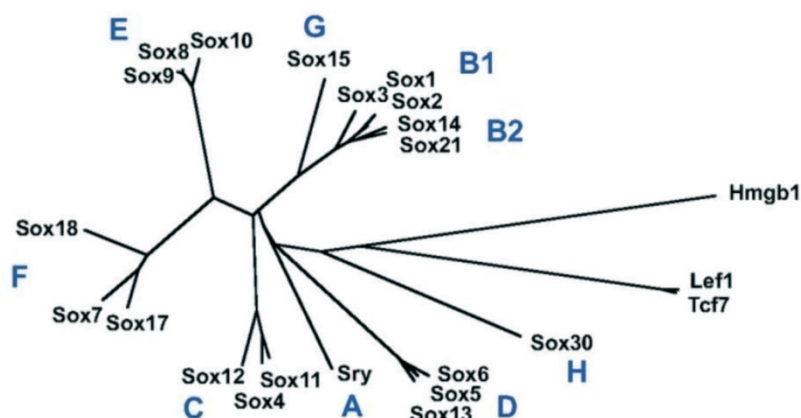


Figura 18. Grupos das proteínas Sox. Árbore filoxenética sen raíz dos dominios HMG de rato en comparación cos dominios HMG de Lef1/Tcf7 (*Lymphoid enhancer binding factor 1/Transcription factor 7, T cell specific*) e Hmgb1 (*High mobility group box 1*), realizado mediante o método computacional Neighbor-Joining (Kamachi, Y. and Kondoh, H., 2013).

7.2. Características xerais do factor de transcrición Sox2

Sox2 é un factor de transcrición que contén un dominio de unión ao DNA denominado HMG e que pertence ao grupo SoxB1 da familia de factores de transcrición Sox. Este factor de transcrición é codificado polo xene Sox2 dun único exón sen intróns localizado no cromosoma 3 tanto en humano como en rato (Collignon, J. et al., 1996; Stevanovic, M. et al., 1994). Este xene contén dúas rexións reguladoras de Sox2 denominadas *enhancer* SRR1 (*Sox2 regulatory region 1*) e SRR2 (*Sox2 regulatory region 2*) (Ura, H. et al., 2011) (**Figura 19**) que exercen a súa actividade en NSCs (Miyagi, S. et al., 2004) e ESCs (Iwafuchi-Doi, M. et al., 2011; Tomioka, M. et al., 2002). O *enhancer* SRR2 é o principal elemento regulador de Sox2 en células nai pluripotentes, ao que se une o propio Sox2 e Oct4 para conducir positivamente a súa expresión durante o estado de pluripotencia (Tomioka, M. et al., 2002).

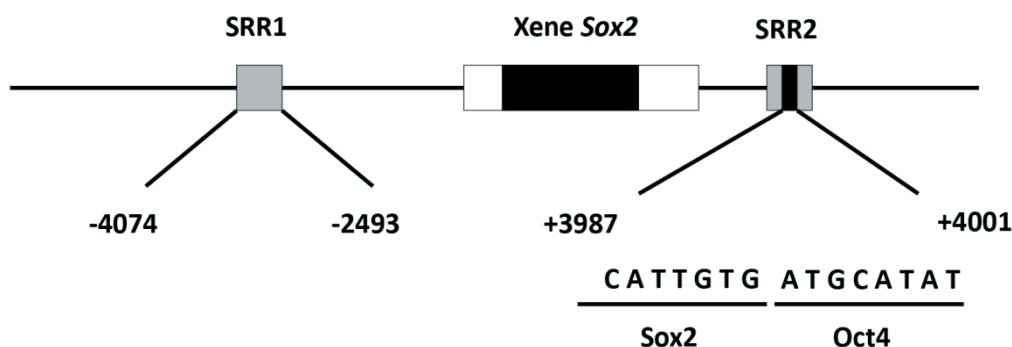


Figura 19. Representación esquemática dos *enhancers* SRR1 e SRR2 no xene *Sox2* (Imaxe adaptada de Ura, H. et al., 2011).

Dous estudos recentes realizados de maneira independente mostraron a existencia de novos *enhancers*. No estudo realizado por Jennifer A. Mitchell e colaboradores (Zhou, H.Y. et al., 2014), eles identifican e validan funcionalmente as secuencias requiridas para a transcrición de *Sox2* baseándose nun modelo computacional que predixo os *enhancers* dentro das 130 kb de *Sox2*. Os seus ensaios revelaron a existencia de tres novos *enhancers*, os *enhancers* SRR18, SRR107 e SRR111, que a través da formación de bucles de cromatina, forman un complexo de cromatina co promotor de *Sox2* en ESCs. Ademais, a realización de análises de delección mostrou que só a rexión que contén o *enhancer* SRR107 e SRR111, denominada SCR (*Sox2 control region*), é requirida para a transcrición de *Sox2* en ESCs. Por outro lado, no estudo levado a cabo por Bing Ren e colaboradores (Li, Y. et al., 2014), identificaron a existencia dun *super-enhancer* (SE) de 13 kb localizado a 100 kb *downstream* de *Sox2* en ESCs. Este *enhancer* está ocupado por múltiples factores de pluripotencia e interacciona fisicamente co promotor de *Sox2* mediante bucles de DNA. Neste caso, a realización de estudos de delección tamén mostrou que o SE é o responsable da maioría da expresión de *Sox2* en ESCs.

Este xene *Sox2* codifica para unha proteína que contén 317 aminoácidos (**Figura 20A**). A proteína *Sox2* está composta de tres dominios principais: un dominio N-terminal curto, o dominio HMG e un dominio C-terminal longo. A secuencia C-terminal inclúe un dominio denominado dominio de transactivación (Kamachi, Y. et al., 1998; Weina, K. and Utikal, J., 2014) (**Figura 20B**).

INTRODUCCIÓN

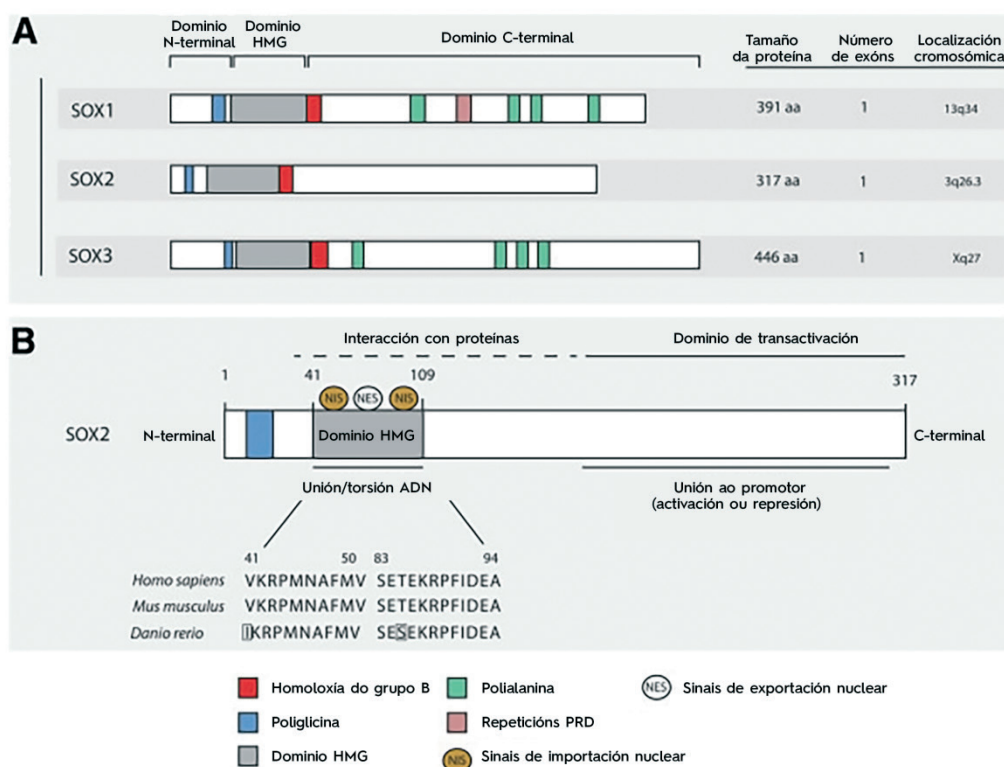


Figura 20. Estrutura e función proteica de Sox2. A, Sox2 pertence ao grupo SoxB1 de proteínas Sox. Hai unha gran homoloxía entre o grupo SoxB1 e todas elas conteñen os tres dominios principais: N-terminal, HMG e C-terminal. B, os dominios proteicos de Sox2 xogan varios papeis funcionais. O dominio HMG de Sox2 permanece bastante conservado entre *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Danio rerio* (Swiss-Prot: P48431, P48432, Q6P0E1). O dominio HMG tamén serve como sitios de unión potenciais para proteínas. Ademais, as sinais de importación nuclear (NIS, nuclear import signals) e as sinais de exportación nuclear (NES, nuclear export signals) únense ao dominio HMG regulándose Sox2 a si mesmo. Finalmente o dominio de transactivación funciona como a rexión responsable da unión do promotor, que á súa vez conduce á activación ou represión de xenes diana (Imaxe adaptada de Weina, K. and Utikal, J., 2014).

Sox2 exprésase en diferentes etapas do desenvolvemento embrionario e a súa expresión persiste en certos tecidos adultos. De feito, Sox2 exprésase ao longo do desenvolvemento inicialmente na ICM do blastocisto e posteriormente nos derivados ectodérmicos, endodérmicos e mesodérmicos así como en células xerminais primordiais. A expresión de Sox2 mantense nos tecidos fetais e adultos derivados de células proxenitoras fetais Sox2 positivas e marca células nai e proxenitoras e nalgúns casos tamén células diferenciadas (**Figura 21**) (Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013).

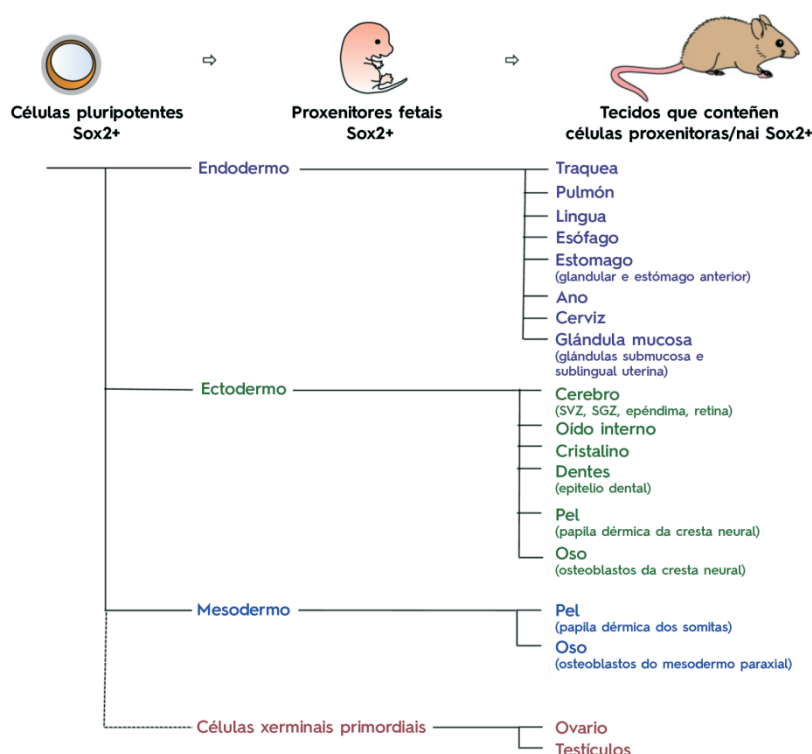


Figura 21. Expresión de Sox2 en células pluripotentes, progenitores embrionarios e células nai adultas (Imaxe adaptada de Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013).

Sox2 presenta polo tanto papeis cruciais nas diferentes etapas do desenvolvemento embrionario e mesmo nos tecidos adultos. Sox2 xoga un papel importante no establecemento e mantemento da pluripotencia nas ESCs, regula a formación de tecido endodérmico, ectodérmico e mesodérmico durante o desenvolvemento fetal e mesmo é relevante na homeostase e rexeneración tisular nalgúns tecidos adultos (Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013). Ademais destas funcións, Sox2 tamén é un dos factores de reprogramación clave para inducir a reprogramación de células somáticas a células pluripotentes chamadas iPSCs (Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006). Por outro lado, con respecto á enfermidade, diversas alteracións en Sox2 asociáronse con enfermidades do desenvolvemento e cancro adultos (Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013). Por exemplo, os humanos que portan unha mutación heterocigótica para Sox2 desenvolven o síndrome anoftálmico-esofágico-xenital (AEG, *anophthalmia-esophageal-genital syndrome*) que se caracteriza por un desenvolvemento anormal dos tecidos ectodérmicos e endodérmicos (Kelberman, D. et al., 2006; Williamson, K.A. et al., 2006). Ademais, diversos estudos mostraron que Sox2 está asociado con numerosos tipos de cancro, mesmo sendo descrito nalgúns casos como un oncoxene (Bass, A.J. et al., 2009; Rudin, C.M. et al., 2012).

7.2.1. Sox2 en ESCs e reprogramación celular

7.2.1.1. Sox2 en ESCs

A expresión de Sox2 detéctase inicialmente nas células no estado de mórula, chegando a estar máis especificamente localizada na ICM do blastocisto e epiblasto durante as etapas máis tardías (**Figura 21**). Isto implica que Sox2 pode ter un papel importante na formación de células embrionarias pluripotentes temperás. De feito, a eliminación cigótica de Sox2 provoca letalidade embrionaria debido á incapacidade para formar o epiblasto pluripotente, mentres que a ausencia de Sox2 non ten efecto na formación do TE. Polo tanto, Sox2 é un factor esencial na formación de células pluripotentes en embrións temperás e en última instancia un factor crítico para o desenvolvemento embrionario (Avilion, A.A. et al., 2003; Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013).

En consistencia cos datos anteriores, as ESCs, que derivan da ICM de blastocistos e que teñen a capacidade de crecer indefinidamente mentres se manteñen nun estado pluripotente e de dar lugar a todos os tipos celulares do corpo adulto, expresan niveis altos de Sox2. A eliminación de Sox2 nas ESCs compromete considerablemente o estado pluripotente destas, como mostran os cambios na morfoloxía celular, a perda de marcadores de expresión pluripotentes, e a súa diferenciación cara TE. Non obstante, a expresión forzada de Oct4 en mESCs deficientes para Sox2 pode rescatar a pluripotencia destas células, indicando que o papel de Sox2 no mantemento do estado pluripotente das ESCs é ante todo para soste un nivel da expresión de Oct4 suficiente. En conxunto, estes resultados demostran que Sox2 é crucial no mantemento da pluripotencia das ESCs, posiblemente a través de promover e manter a expresión de Oct4 (Fong, H. et al., 2008; Masui, S. et al., 2007).

De maneira interesante, para manter a pluripotencia das células nai, os niveis de expresión de Sox2 precisan estar regulados rigorosamente, xa que niveis máis altos ou máis baixos de expresión de Sox2 conducen á perda de pluripotencia en ESCs. Isto podería atribuírse ao feito de que niveis altos ou baixos de Sox2 reducen a actividade promotora/*enhancer* dos xenes diana de Sox2-Oct4 (Boer, B. et al., 2007; Kopp, J.L. et al., 2008). O nivel de expresión de Sox2 precisa manterse nun equilibrio dinámico con outros factores sinérxicos para manter a pluripotencia. Este concepto está tamén apoiado polo feito de que Sox2 coopera con outros factores de transcrición altamente dependentes de dose, como Oct4 e Nanog, na regulación da pluripotencia (Boyer, L.A. et al., 2005). En mESCs e hESCs, Oct4, Sox2 e Nanog forman un núcleo regulador transcricional nas células nai pluripotentes para manter a súa autorrenovación. Oct4 e Sox2 ocupan á vez un gran número de promotores/*enhancers* e regulan os niveis de expresión dos seus xenes diana (Boyer, L.A. et al., 2005; Chen, X. et al., 2008). Curiosamente, ambos factores de transcrición tamén se unen aos seus propios *enhancers* activando un bucle autorregulatorio (Chew, J.-L. et al., 2005; Okumura-Nakanishi, S. et al., 2005; Tomioka, M. et al., 2002). Polo tanto, Sox2 e Oct4 activan a expresión de xenes pluripotentes, incluíndo Nanog e eles mesmos, mentres que reprimen a expresión de xenes clave

que son responsables para a diferenciación *in vitro* e procesos do desenvolvemento *in vivo* (Boyer, L.A. et al., 2005; Chen, X. et al., 2008; Zhang, S. and Cui, W., 2014) (**Figura 22**).

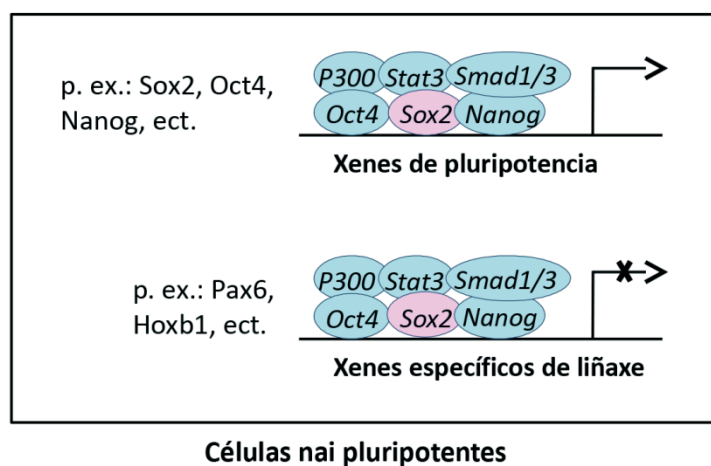


Figura 22. Sox2 regula a expresión xénica en ESCs. Sox2 interacciona con Oct4 e outros factores nucleares para activar a expresión de xenes pluripotentes e reprimir a expresión de xenes de diferenciación en ESCs (Imaxe adaptada de Zhang, S. and Cui, W., 2014).

Esta actividade reguladora transcricional de Sox2 e Oct4 require a súa interacción directa (Ambrosetti, D.C. et al., 2000). A interacción cooperativa entre o dominio HMG de Sox2 e o homeodominio POU (Pit-Oct-Unc) de Oct4, é crítica na regulación da pluripotencia nas ESCs (Dailey, L. and Basilico, C., 2001).

7.2.1.2. Sox2 en reprogramación celular

Dado que Sox2 é esencial para o establecemento e o mantemento da pluripotencia nas ESCs, non é estraño que Sox2 sexa un dos factores clave para a xeración de iPSCs a partir de células somáticas no proceso de reprogramación celular (Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006; Takahashi, K. et al., 2007). Sox2 é requirido cara o final da reprogramación (Chen, J. et al., 2011), probablemente mediante a activación da súa propia transcrición así como a de centos de dianas asociadas a pluripotencia para estabilizar o estado pluripotente. De feito, un estudo recente realizado por Jaenisch e colaboradores suxeriu que a activación de Sox2 endógeno durante a reprogramación celular inicia unha cascada de eventos transcricionais que ten lugar exclusivamente en células destinadas a formar iPSCs (Buganim, Y. et al., 2012). Sox2 pode emprazarse por membros da familia Sox estreitamente relacionados, como Sox1 e Sox3, na xeración de iPSCs, pero non por membros máis distantes como Sox7 ou Sox15 (Nakagawa, M. et al., 2008).

7.2.2. Sox2 en células nai e proxenitoras adultas

Algúns estudos indican que os tecidos que requiren Sox2 durante o desenvolvemento continúan a expresar este factor nalgúns células proxenitoras e nai adultas derivadas deste tecido (**Figura 21**). Empregando o rato *knockin* (KI) Sox2-GFP, Pevny e colaboradores, foron os primeiros en demostrar que Sox2 non se só expresa nos proxenitores neurais fetais, senón que tamén en células proliferantes no Sistema Nervioso Central (CNS, *Central Nervous System*), especificamente en rexións neuroxénicas, como a zona subventricular do ventrículo lateral, a zona subgranular do hipocampo así como a epéndima do canal central adulto. As células proxenitoras neurais (NPCs, *Neural progenitor cells*) adultas Sox2 positivas illadas poden propagarse en cultivo mentres manteñen a súa capacidade para diferenciarse en neuronas, astrocitos e oligodendrocitos, mostrando así a súa autorrenovación e multipotencia *in vitro* (Ellis, P. et al., 2004; Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013).

Sox2 marca ademais poboacións de células nai e proxenitoras noutros tecidos adultos que dependen da expresión de Sox2 durante o desenvolvemento. Por exemplo, detectáronse células Sox2 positivas en proxenitores da retina adulta (Taranova, O. V et al., 2006) traquea (Que, J. et al., 2009), epitelio da lingua (Okubo, T. et al., 2009) e a papila dérmica do folículo piloso (Biernaskie, J. et al., 2009; Driskell, R.R. et al., 2009) así como en proxenitores putativos da glándula hipofisaria (Fauquier, T. et al., 2008). Máis recentemente, Arnold e colaboradores, realizaron experimentos de trazado de liñaxe sistemáticos para determinar a expresión de Sox2 en tecidos adultos. En concreto, eles empregaron o rato KI Sox2-GFP para trazar o destino celular das células que expresan Sox2 en tecidos adultos. Eles confirmaron o patrón de expresión de Sox2 en zonas neuroxénicas do cerebro, retina, lingua, traquea e epitelio bronquiolar e tamén identificaron por primeira vez a expresión de Sox2 en testículos, cerviz, epitelio do cristalino, estómago glandular e epitelio escamoso do esófago (**Figura 21**) (Arnold, K. et al., 2011; Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013).

A ampla expresión de Sox2 nestes tecidos que se renovan levou a Arnold e colaboradores a determinar a contribución das células que expresan Sox2 á homeostase tisular. Con este fin, eles xeraron uns ratos modificados xenéticamente, que albergan un alelo Cre (CreER) inducible por Tamoxifeno (TAM) ou un xene suicida (HSTK, *Herpes Simplex Thymidine Kinase*) no locus de Sox2, co fin de realizar mapas de destino e experimentos de trazado de liñaxe das células que expresan Sox2, así como de eliminar as células Sox2 positivas tras a administración dun tratamento. A administración de TAM a ratos Sox2-CreER/ROSA26-lsl-EYFP adultos provocou a marcaxe inicial das células dentro dos testículos, do píloro e do corpo do estómago glandular e da capa basal do cristalino, así como dentro doutros tecidos que expresan Sox2, como a lingua, o esófago, o estómago anterior, o cerviz e o ano. Varios meses despois da administración de TAM, todos estes tecidos aínda eran fortemente positivos para YFP. A persistencia a longo prazo e a expansión das células YFP positivas nestes experimentos de trazado de liñaxe mostrou

que as células Sox2 positivas eran células nai adultas. As células nai adultas Sox2 positivas poden ser unipotentes, como é o caso, das células nai do cristalino ou multipotentes, como no estómago, onde estas células nai Sox2 positivas diferencianse en células parietais, neuroendocrinas e células produtoras de mucina do estómago glandular. Por outro lado, a administración de TAM a femias preñadas Sox2-CreER/ROSA26-lsl-EYFP entre os estadios E13.5 e E15.5 induciu a expresión de YFP nos tecidos adultos que expresan Sox2, sostendo a idea de que as células nai adultas Sox2 positivas proceden de proxenitores fetais Sox2 positivos (Arnold, K. et al., 2011).

Finalmente, para corroborar a función das células que expresan Sox2 no mantemento da homeostase de diferentes tecidos adultos, Arnold e colaboradores xeraron o rato KI Sox2-TK a partir das ESCs nas cales o xene da Timidina Kinasa truncada (deltaTK) do Virus do Herpes Simple tipo 1 (HSV-1) se insertou no locus endóxeno de Sox2 (**Figura 23**). A administración de ganciclovir (GCV) a estes ratos Sox2-TK adultos, provoca a morte celular das células Sox2 positivas tras transformarse o GCV nun metabolito tóxico para as células (Arnold, K. et al., 2011).

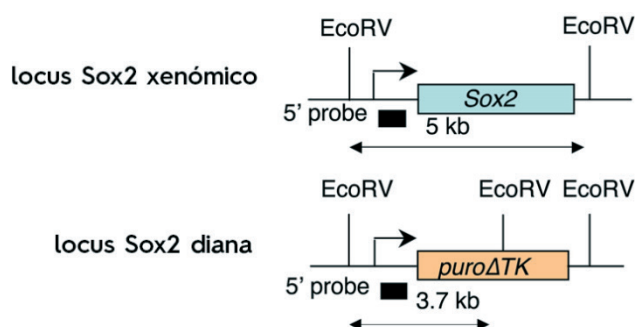


Figura 23. Estratexia para xerar o rato KI Sox2-TK
(Imaxe adaptada de Arnold, K. et al., 2011).

Como era de esperar, a administración de GCV aos ratos Sox2-TK provocou unha apoptose masiva das células que expresan Sox2, provocando grandes defectos na homeostase tisular que conduciu á morte dos ratos despois de dúas semanas de tratamento. Cando o tratamento se retirou despois dunha semana, o fenotipo patolóxico reverteu a normal, concomitante coa reposición de proxenitores Sox2 positivos nestes tecidos. Polo tanto, eles demostran que as células Sox2 positivas son esenciais para o mantemento da homeostase tisular normal e tamén, en último caso, para a supervivencia do rato, xa que a eliminación destas células Sox2 positivas altera a homeostase e provoca letalidade (Arnold, K. et al., 2011).

Ademais de presentar un papel no mantemento da homeostase tisular, Sox2 está implicado na reparación de tecidos. A rexeneración do nervio periférico é un claro exemplo do papel de Sox2 na reparación de tecidos. Despois da lesión, as

células adultas maduras de Schwann reexpresan Sox2, perden as súas vainas de mielina e desdiferencianse a un estado tipo célula proxenitora. Sox2 parece xogar un papel directo neste proceso por organizar a agrupación das células Schwann, un evento clave durante a rexeneración do nervio, mediante a reubicación de moléculas de N-cadherina. Este proceso polo tanto permite ás células de Schwann formar cordóns multicelulares para guiar o recrecemento do axón cara o sitio da lesión (Parrinello, S. et al., 2010). Sería polo tanto moi interesante determinar se Sox2 se reactiva e xoga papeis funcionais noutros tecidos que experimentan dano celular por promover a desdiferenciación, ou a expansión de proxenitores residentes.

7.2.3. Sox2 en cancro

Varios estudos experimentais e clínicos mostraron que Sox2 está asociado con numerosos tipos de cancro e incluso foi descrito nalgúns casos como un onco-xene. Sox2 controla a fisioloxía das células cancerixenas promovendo as vías de sinalización oncoxénicas e participa no mantemento das células nai cancerixenas (Weina, K. and Utikal, J., 2014).

A sobreexpresión de Sox2 nalgúns tipos de tumores, pode ser debido a un fenómeno coñecido como amplificación xénica que consiste no incremento do número de copias dunha rexión cromosómica particular. Neste caso, a amplificación do locus de SOX2 atopouse en varios tipos de cancros, como por exemplo en glioblastoma (14,4%), SCC de pulmón (23%) e esófago (15%) humanos así como no 27% dos SCLC humanos analizados (**Táboa 1**) (Annovazzi, L. et al., 2011; Bass, A.J. et al., 2009; Rudin, C.M. et al., 2012; Weina, K. and Utikal, J., 2014). En cambio, noutros tipos de cancros, Sox2 non ten porque estar xeneticamente amplificado, senón que a expresión de Sox2 pode estar regulada a nivel transcricional ou epixenético, como acontece, por exemplo, no caso de carcinomas de célula escamosa de pel (Boumahdi, S. et al., 2014).

Tal e como definían Hanahan e Weinberg, o cancro é unha enfermidade caracterizada por determinadas características como a proliferación sostida, a activación da invasión e a metástase celular e a evasión da morte celular, entre outras (Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011). Diversos estudos asociaron estreitamente Sox2 a estas respectivas características do cancro, e até o momento, mostrouse que SOX2 promove a proliferación celular en cancro de mama, próstata, páncreas e cerviz (Herreros-Villanueva, M. et al., 2013; Ji, J. and Zheng, P.-S., 2010; Jia, X. et al., 2011; Stolzenburg, S. et al., 2012), evade as sinais apoptóticas en cancro gástrico, de próstata e carcinomas de pulmón de células non pequenas (NSCLC, *Non Small Cell Lung Carcinoma*) (Chen, S. et al., 2014; Hütz, K. et al., 2014; Jia, X. et al., 2011) e promove a invasión, migración e metástase en carcinoma hepatocelular e cancro de ovario, gástrico, glioma, cancro colorectal e melanoma (Alonso, M.M. et al., 2011; Girouard, S.D. et al., 2012; Han, X. et al., 2012; Lou, X. et al., 2013; Sun, C. et al., 2013). De todas formas, tal e como mostra a **Táboa 1**, a implicación de SOX2 na fisioloxía da células cancerixenas varía entre os diferentes tipos de cancro e ademais, algúns destes fenotipos (proliferación celular, invasión, migración, metástase etc.) vin-

culáronse a vías de sinalización oncoxénicas particulares, como WNT/ β -catenina, EGFR, mTOR, etc. (Weina, K. and Utikal, J., 2014).

TIPO DE CANCRO	AMPLIFICACIÓN XÉNICA DE SOX2	FUNCIÓN DE SOX2	VÍAS/PROCESOS
Mama	Non	↑proliferación celular, ↑formación de colonias, ↑↓invasión, ↑metástase	↑WNT/ β -CATENIN, ↑EMT, ↓AMPK/mTOR
Cervical	Descoñécese	↑proliferación celular, ↑clonoxenicidade, ↑tumorixenicidade	Descoñécese
Colorectal	Descoñécese	↑↓proliferación celular, ↑metástase, ↑senescencia, ↑autofaxia ↑crecemento tumoral, ↑invasión, ↑migración, ↑crecemento dependente de ancoradoiro	↑BMP, ↓mTOR, ↑MET, ↑WNT/ β -CATENIN
SCC esofágico	Sí	↑proliferación tumoral, ↑crecemento tumoral	↑Akt/mTORC1, ↑STAT3
Gástrico	Descoñécese	↑↓apoptose, ↑↓proliferación celular, ↑migración	↑sinalización AKT
Glioblastoma, GBM, meduloblastoma, oligodendroglioma	Sí	↑promover hipometilación, ↑invasión, ↑migración, ↑autorrenovación CSCs, ↑proliferación celular, ↑formación de colonias	Descoñécese
Carcinoma hepatocelular	Descoñécese	↑invasión, ↑formación de esferas	↑EMT
Larínxeo	Descoñécese	↑invasión/migración	↑MMP-2 ↑PI3L/AKT/mTOR
Melanoma	Descoñécese	↑invasión, ↑volume tumoral, ↑autorrenovación CSCs	↑sinalización Hedgehog-GLI
SCC oral	Sí	Descoñécese	Descoñécese
Osteosarcoma	Descoñécese	↑autorrenovación CSCs, ↑tumorixenicidade, ↑desdiferenciación	↓WNT/ β -CATENIN
Ovárico	Descoñécese	↑migración, ↑invasión, ↑formación de colonias	Descoñécese
Pancreático	Descoñécese	↑proliferación celular, ↑desdiferenciación	↑EMT
Próstata	Descoñécese	↑autorrenovación CSCs, ↑proliferación celular, ↑supervivencia celular ↑metástase, ↑migración, ↓apoptose, ↓entrada de Ca^{2+} almacenada	↓ Ca^{2+} canais, ↑EMT, ↓Survivin, ↑WNT/ β -CATENIN, ↑EGFR/PI3K/AKT
SCLC, SCC de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, NSCLC	Sí	↑proliferación celular, ↑supervivencia celular, ↓apoptose, ↑migración, ↑crecemento dependente de ancoradoiro, ↑autorrenovación CSCs, ↑metástase, ↓autofaxia, ↑formación de tumores	↑MAP4K4-Survivin, ↓EGFR/Src/Akt ↓BMP4
Sinonasal	Sí	Descoñécese	Descoñécese
Carcinoma de célula transicional	Descoñécese	↑ <i>splicing</i> alternativo	Descoñécese

Táboa 1. Táboa que mostra a amplificación do locus SOX2, as funcións de SOX2 e as vías de sinalización oncoxénica implicadas en diferentes tipos de cancro. SOX2 pode estar amplificado e é funcionalmente relevante en varios tipos de cancro. SOX2 en cancro funciona a través de múltiples mecanismos que varían

INTRODUCCIÓN

dependendo do tipo de cancro. Non obstante, na maioría dos casos, SOX2 aumenta a proliferación celular, a invasión, a migración, a metástase e a autorrenovación de CSCs. Ademais, algúns destes fenotipos vinculáronse a vías de sinalización oncoxénicas. ↑= Promove/Aumenta, ↓= Suprime/Inhibe ↑↓= Investigación conflitiva (Táboa adaptada de Weina, K. and Utikal, J., 2014).

Como comentamos anteriormente Sox2 en cancro funciona a través de múltiples mecanismos que varían dependendo do tipo de cancro. Por exemplo, con respecto á proliferación celular, o KD de SOX2 en células cancerixenas pancreáticas provocou a inhibición do crecemento celular, mentres a súa sobreexpresión promoveu a proliferación (Herreros-Villanueva, M. et al., 2013). Non obstante, esta implicación de SOX2 na proliferación celular foi discutida de forma controvertida no caso do cancro gástrico ou colorectal, onde algúns autores sosteñen que SOX2 promove a proliferación e outros que a inhibe (Fang, X. et al., 2010; Hütz, K. et al., 2014; Liu, H. et al., 2013; Otsubo, T. et al., 2008). Este efecto contraditorio de Sox2 na proliferación celular suxire que Sox2 xoga un papel diferencial dependendo do tipo de cancro. Ademais de presentar un papel na proliferación celular, SOX2 tamén xoga un papel importante na evasión de sinais apoptóticas e na regulación da invasión, migración celular e metástase (Weina, K. and Utikal, J., 2014). Neste último papel de SOX2, por exemplo, tense demostrado que a expresión esóxena de Sox2 na liña celular de cancro de larinxe humano Hep-2, que expresa niveis baixos de SOX2, promove substancialmente a capacidade de migración e invasión destas células en cultivo. Ademais, estas células Hep-2 que sobreexpresan Sox2 mostraron un fenotipo transición epitelio-mesenquima (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*), como evidenciou a súa morfoloxía mesenquimal, a diminución da expresión do marcador epitelial E-cadherina e o aumento da expresión de marcadores mesenquimais como N-cadherina, Vimentina e Fibronectina (Yang, N. et al., 2014).

Por outro lado, Sox2, a parte de contribuír aos procesos fisiolóxicos ou patofisiolóxicos das células cancerixenas, tamén desempeña un papel nas CSCs similar ao que xoga nas células nai embrionarias. Nun estudo realizado por José Palacios e colaboradores (Rodríguez-Pinilla, S.M. et al., 2007), a expresión de SOX2 atopouse nun 16,7 % de carcinomas de mama invasivo negativo - nodo esporádico e SOX2 foi de maneira significativa máis frecuentemente expresado en carcinomas de mama de tipo basal, polo tanto, SOX2 foi expresado preferentemente en células cancerixenas de mama cun fenotipo de tipo basal, e pode contribuír a definir as características dun fenotipo tipo “células nai” ou de células menos diferenciadas. Un fenómeno similar aconteceu en estudos realizados en carcinoma de célula escamosa oral (OSCC, *Oral Squamous Cell Carcinomas*) e en carcinoma de célula escamosa de pescozo e cabeza (HNSCC, *Head Neck Squamous Cell Carcinomas*), onde SOX2 expresouse principalmente no estrato basal, colocalizando coa rexión que contén células nai (Lu, W. et al., 2014; Walter, V. et al., 2013). Ademais da súa aplicación en identificar ou distinguir diferentes subconxuntos de células tumorais, Sox2 tamén xoga un papel clave no mantemento das características de célula nai das CSCs ou TICs. Por exemplo, o KD de SOX2 nas CSCs procedentes de glioblastoma humano

adulto conduce á inhibición da proliferación e á perda de tumorixenicidade en ratos inmunodeficientes, indicando que Sox2 é crucial no mantemento da capacidade de autorrenovación das CSCs (Gangemi, R.M.R. et al., 2009). Sox2 tamén mantén a autorrenovación das CSCs en osteosarcomas porque a diminución de Sox2 reduce drasticamente as súas propiedades de transformación *in vitro* e a súa capacidade para formar tumores, sendo polo tanto Sox2 un factor de supervivencia e un novo biomarcador da autorrenovación en osteosarcomas (Basu-Roy, U. et al., 2012). Estes estudos e máis que foron realizados durante estes últimos anos revelaron, polo tanto, que a expresión de Sox2 promove e mantén as características de células nai das CSCs ou TICs.

7.2.4. Regulación transcricional de Sox2 polo supresor tumoral p27^{Kip1}

Como xa se comentou ao longo da introdución, a reprogramación celular é un proceso reproducible, lento e ineficiente (Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006) que presenta unha serie de barreiras celulares. Varios estudos publicados simultaneamente mostraron que algúns supresores tumorais, como os codificados polo xene de p53 e o locus *Ink4a/Arf*, constitúen unha barreira que se opón ao proceso de reprogramación celular e que limita a eficiencia deste (Banito, A. et al., 2009; Hong, H. et al., 2009; Kawamura, T. et al., 2009; Li, H. et al., 2009; Marion, R.M. et al., 2009; Utikal, J. et al., 2009). Co obxectivo de estudar o papel doutros xenes supresores de tumores no proceso de reprogramación celular, Manuel Serrano e colaboradores (Li, H. et al., 2012) decidiron investigar o papel do supresor tumoral p27^{Kip1} durante a reprogramación. O supresor tumoral p27^{Kip1} únese e inhibe múltiples CDKs. A kinasa 2 dependente de ciclina (CDK2) é unha das principais CDKs inhibidas por p27 (Besson, A. et al., 2008). Non obstante, as principais características fenotípicas dos ratos deficientes en p27 (tamaño corporal incrementado, hiperplasia de órganos, tumores hipofisarios e displasia retinal) (Fero, M.L. et al., 1996; Kiyokawa, H. et al., 1996; Nakayama, K. et al., 1996) non se rescatan tras a eliminación de Cdk2, o que suxire que este fenotipo dos ratos deficientes en p27 non está primeiramente causado pola actividade descontrolada da CDK2 (Aleem, E. et al., 2005; Martín, A. et al., 2005).

A primeira observación de Manuel Serrano e colaboradores foi que as células, neste caso, os MEFs deficientes en p27 poden reprogramarse a iPSCs na ausencia de Sox2 ectópico. Curiosamente, os MEFs e tecidos procedentes de ratos deficientes en p27, como cerebro, pulmón e retina, presentan unha expresión basal elevada de Sox2, suxerindo que p27 contribúe á represión de Sox2 en células diferenciadas e tecidos. Posteriormente, para definir o papel represivo de p27 sobre Sox2, os autores analizan a diferenciación de iPSCs deficientes en p27 tras o tratamento con ácido retinoico (RA, *retinoic acid*) e observan que os niveis de Sox2 non se reducen, polo que se deduce que efectivamente, p27 exerce un efecto represivo en Sox2 que é relevante durante a diferenciación. Por outra parte, a realización de varios ensaios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation Assay*) mostrou que tras a diferenciación p27 asociase ao *enhancer* SRR2 do xene Sox2, o principal elemento regulador responsable da expresión de

INTRODUCCIÓN

Sox2 en células nai pluripotentes, xunto co complexo represivo p130-E2F4-SIN3A, e xuntos contribúen á represión de Sox2 tras a diferenciación celular (**Figura 24**). A ausencia de p27 no complexo represivo que se une ao *enhancer* SRR2 conduce a unha alteración das marcas de histonas activas e represivas presentes neste *enhancer*, polo que, a represión de Sox2 realízase mediante a alteración da paisaxe epixenética arredor deste *enhancer* SRR2. Tamén é de importancia sinalar, que non só a ausencia de p27 provoca un incremento nos niveis de Sox2, senón que o KD de dous compoñentes do complexo represivo, a proteína pocket p130 e E2F4, tamén resulta nun aumento significativo da expresión de Sox2 (Li, H. et al., 2012).

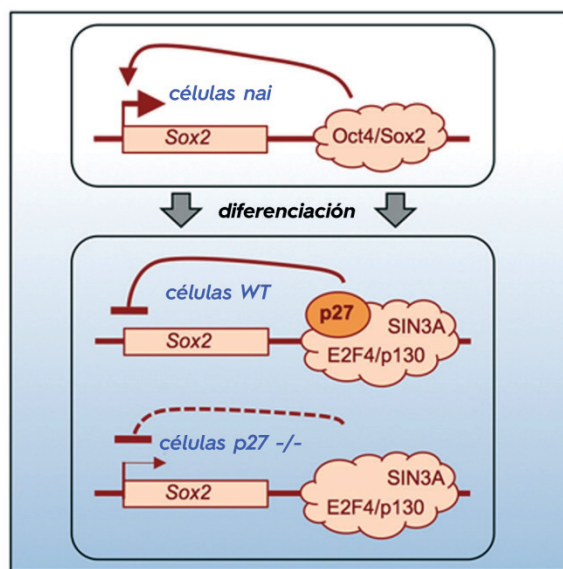


Figure 24. O supresor tumoral p27 reprime o xene de pluripotencia Sox2. Tras a diferenciación das células nai, un complexo represivo que contén p27 e p130-E2F4-SIN3A únese ao *enhancer* SRR2 do xene Sox2. Na ausencia de p27, a represión é incompleta, permitindo niveis altos de Sox2, o cal pode resultar no desenvolvemento de tumores (Imaxe adaptada de Li, H. et al., 2012).

Finalmente, os autores preguntáronse se a represión incompleta de Sox2 observada en tecidos e células deficientes en p27 podería mediar algunha das características fenotípicas do rato deficiente en p27. Para avaliar isto, xeraron un rato heterocigoto deficiente para Sox2 (xa que o rato homocigoto deficiente para Sox2 non é viable) e cruzárono cun rato deficiente para p27. Posteriormente, eles observaron que as principais características fenotípicas asociadas coa deficiencia de p27, como son o xigantismo, a hiperplasia hipofisaria, os tumores hipofisarios e os defectos na retina, eran rescatadas cando a deficiencia de p27 se combina coa heterocigosidade de Sox2 (Li, H. et al., 2012).

En conxunto, estes resultados, ademais de demostrar que o supresor tumoral p27 contribúe á represión transcricional de Sox2 durante a diferenciación, tamén desvelan unha conexión entre p27 e Sox2 relevante para a reprogramación e o cancro e para entender as patoloxías humanas asociadas con mutacións na liña xerminal en p27 (Li, H. et al., 2012).

OBXECTIVOS



1. No momento de comezar este proxecto, resultados previos mostraron que tras a diferenciación das ESCs o complexo represivo p27-p130-E2F4-SIN3A, do cal o membro da familia das proteínas *pocket* p130 forma parte, únese ao *enhancer* SRR2 do xene Sox2, conducindo á represión transcricional de Sox2 en células diferenciadas. Este feito, xunto coas similitudes que hai entre os procesos de reprogramación celular e a transformación oncoxénica, como a presenza de xenes supresores de tumores como p53 ou o locus *Ink4a/Arf* que constitúen unha barreira celular para ambos procesos, levounos a que un dos obxectivos desta tese sexa **estudar a regulación transcricional de Sox2 en cancro**.

2. Por outro lado, a diminución da capacidade homeostática e rexenerativa dos diferentes tecidos e órganos do noso corpo é un dos signos máis obvios do proceso de avellentamento. Dado o papel directo que desempeñan as células nai adultas no mantemento da homeostase tisular normal e na capacidade reparadora e rexenerativa de moitos tecidos en resposta a un dano ou lesión, postulouse que perdas no número, na funcionalidade das células nai ou mesmo cambios no destino destas, poderían contribuír de maneira significativa ás características fenotípicas do avellentamento. Desta forma, o esgotamento das células nai é considerado unha das nove características que contribúen ao proceso de avellentamento e que determinan o fenotipo de avellentamento en diferentes organismos. Tendo en conta isto, e que o factor de transcrición Sox2 exprésase amplamente marcando poboacións de células nai e proxenitoras en diferentes tecidos adultos como cerebro, retina, lingua, traquea, testículos, cerviz, etc., propuxémonos como segundo obxectivo deste traballo **estudar o efecto da eliminación de células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas sobre o proceso de avellentamento**.

MATERIAL E MÉTODOS



1. RATOS MODIFICADOS XENETICAMENTE E TRATAMENTO

1.1. Condicións de estabulación

Os animais de experimentación utilizados neste traballo mantivéronse estabulados en salas SPF (*Specific Pathogen Free*) baixo condicións controladas de fotoperiodo (12 horas de luz/escuridade) e temperatura (20-24°C). Os animais foron sacrificados por asfixia mediante inhalación de CO₂. Todos os procedementos experimentais con estes animais foron levados a cabo baixo a aprobación do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela (USC) (Número de protocolo: 15005AE/07/01/02/05C/AVF2), respectando as Leis de Protección dos Animais utilizados para experimentación e outros fins científicos a nivel Estatal e Europeo.

1.2. Ratos KO para as proteínas *pocket* (Rb, p107 e p130)

1.2.1. Rato Rb +/-

No ano 1992, Jacks, T. et al., 1992, eliminan un dos alelos do xene Rb en ESCs de rato mediante a inserción dun casete de expresión de neomicina no terceiro intrón do xene. Posteriormente, inxectan estas ESCs heterocigotas en embrións en estado de blastocisto da cepa C57BL/6 dando lugar a quimeras que foron capaces de transmitir por liña xermal. Estes ratos heterocigotos para Rb non desenvolve-ron retinoblastoma pero si tumores hipofisarios do lóbulo intermedio e carcinoma medular de tiroide aos 8 e 10 meses de idade.

Os ratos homocigotos para Rb, xéranse a partir do cruce dunha femia e un macho heterocigoto para Rb e presentan letalidade embrionaria entre os estadios E13.5 e E15.5 debido a unha inhibición da eritropoese hepática e morte neuronal.

1.2.2. Rato p107 -/-

O xene p107 inactivouse en ESCs de rato por recombinación homóloga que resultou na substitución dun fragmento de 2.3 kb do xene p107 por un casete de expresión de neomicina. Estas ESCs heterocigotas inxéctanse en blastocistos C57BL/6 que dan a lugar a quimeras que foron capaces de transmitir a mutación a través da liña xermal. Os ratos homocigotos para p107, xéranse a partir do cruce dunha femia e un macho heterocigoto para p107 e son perfectamente viables e fértiles. Tanto os ratos heterocigotos como homocigotos para p107 non presentan anormalidades no desenvolvemento nin patoloxías (Lee, M.H. et al., 1996).

1.2.3. Rato p130 -/-

Para producir este rato p130 -/-, a rexión 5'proximal do exón do xene p130 foi substituída por un xene de resistencia a neomicina por recombinación homóloga en ESCs. As ESCs heterocigotas inxéctanse en embrións en estado de blastocisto da cepa C57BL/6 dando lugar a quimeras que foron capaces de transmitir por liña xermal. Os ratos homocigotos para p130 xéranse a partir do cruce dunha femia e un macho heterocigoto para p130. Os ratos heterocigotos e homocigotos para

MATERIAL E MÉTODOS

p130 presentan un tamaño e unha aparencia normal, á vez que se reproducen sen problema (Cobrinik, D. et al., 1996).

1.3. Rato reprogramable i4F

Este rato reprogramable i4F xerouse tras a transdución de MEFs procedentes dun rato C57BL/6 que portan un activador transcricional inducible por tetraciclina (rtTA) no locus *Rosa26* cun vector lentiviral que porta un casete tetracistrónico inducible por tetraciclina que codifica para os catro factores de reprogramación (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) denominado Tet-O-FUW-OSKM. Tras a transdución lentiviral, os MEFs trátanse con 1 µg/mL de doxiciclina (un análogo da tetraciclina) e xéranse colonias iPCs despois dunha semana. Estas iPCs pícanse, expándense e microinixéctanse en blastocistos da cepa albina C57BL/6J-Tyr^{c-2J}/J, dando lugar a quimeras que se cruzan con ratos C57BL6/J para transmitir os transxenes lentivirais nas proporcións mendelianas obtendo finalmente un rato reprogramable i4F nun fondo xenético puro C57BL6/J (Abad, M. et al., 2013).

1.4. Rato Sox2-TK e tratamento con GCV

O rato KI Sox2-TK xerouse a partir das ESCs nas cales o xene da *Timidina Kina-sa* truncada (deltaTK) do HSV-1 se insertou no locus endógeno de Sox2. Estas ESCs microinixectáronse en blastocistos BDF1 e transferíronse a femias pseudopreñadas dando lugar a unha quimera que se cruzou cun rato 129SvJae. Os descendentes destes cruzáronse até establecer liñas estables. Cando se trata a estes animais con GCV, as células Sox2 positivas que están en división nos diferentes órganos onde Sox2 é expresado morren (Arnold, K. et al., 2011).

Neste traballo tratamos aos ratos Sox2-TK a partir das 8 semanas de idade, administrando por inxección intraperitoneal 100 mg/kg de GCV (Cymevene 500 mg, Roche) en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma-Aldrich) ou o vehículo (HBSS) cada 2 semanas durante as 56 ou 36 semanas de vida do animal, propinando un total de 24 ou 14 administracións, respectivamente.

1.5. Rato Rb-het/Sox2-TK e tratamento con GCV

O rato Rb-het/Sox2-TK é o resultado do cruce entre o rato Rb +/- e o Sox2-TK que mencionamos nos apartados anteriores.

Neste traballo tratamos aos ratos Rb-het/Sox2-TK a partir das 6 semanas de idade, administrando por inxección intraperitoneal 100 mg/kg de GCV (Cymevene 500 mg, Roche) en HBSS (Sigma-Aldrich) ou o vehículo (HBSS) cada 2 semanas durante as primeiras 20 semanas de vida do animal, logo cambiase a unha única inxección cada 4 semanas, completando un total de 12 administracións.

1.6. Xenotipado

O xenotipado realizouse en todos os casos extraendo DNA xenómico do extremo da cola do rato con 200 µl de Chelex 10% (*Chelex 100 Sodium form*, Sigma-Aldrich) e 20 µl de Proteasa 20 mg/mL (*Protease from Streptomyces griseus*, Sigma

Aldrich) tras unha incubación a 60°C durante toda a noite e outra posterior a 95°C durante 15 minutos. Transcorridas ambas incubacións, as mostras centrifugáronse a 13.000 rpm durante 5 minutos para eliminar os restos non dixeridos e ficar co sobrenadante que é onde se atopa o DNA.

Posteriormente realizamos unha reacción en cadea da polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) para amplificar a secuencia específica de cada xenotipo con 1 µl de DNA, os oligonucleótidos segundo o rato a xenotipar (**Táboa 2**), os dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates, Thermo Scientific) e o Kit NZYTaQ DNA polymerase que proporciona o tampón de reacción 10X, o MgCl₂ 50 mM e a Taq DNA polimerasa 5U/µl (NzyTech). Cada amplificación realizouse baixo as condicións específicas para cada xenotipo e os fragmentos esperados visualizáronse mediante eletroforese en xeles de agarosa (ver apartado 3.4.2. *Eletroforese en xel de agarosa*).

RATO	OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA 5'→ 3'
Rb +/-	COMÚN	AAT TGC GGC CGC ATC TGC ATC TTT ATC GC
	ALELO WT	CCC ATG TTC GGT CCC TAG
	ALELO KO	GAA GAA CGA GAT CAG CAG
p107 -/-	COMÚN	TCG CTG GCA GTC TGA GTC AG
	ALELO WT	TGT GCT GAG CAT GAA CAG AC
	ALELO KO	ACG AGA CTA GTG AGA CGT GC
p130 -/-	COMÚN	TAC ATG GTT TCC TTC AGC GG
	ALELO WT	ACG GAT GTC AGT GTC ACG
	ALELO KO	GAA GAA CGA GAT CAG CAG
Reprogramable i4F	ALELO ROSA26 COMÚN	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
	ALELO ROSA26 WT	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG
	ALELO ROSA26 MUTANTE	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC
	ALELO OKSM 1	GGA TGG AGT GGG ACA GAG AA
	ALELO OSKM 2	GTG CCG ATC CGT TCA CTA AT
Sox2-TK	ALELO WT	CTAGGCCACAGAATTGAAA- GATCT
		GTAGGTGGAAATTCTAGCAT- CATCC
	ALELO KI	GTAATGACAAGCGCCCAGA
		ATGCTGCCCATTAAGGTATC

Rb-het/ Sox2-TK (dúas PCRs independentes)	Rb +/-	COMÚN	AAT TGC GGC CGC ATC TGC ATC TTT ATC GC
		ALELO WT	CCC ATG TTC GGT CCC TAG
		ALELO KO	GAA GAA CGA GAT CAG CAG
	SOX2-TK	ALELO WT	CTAGGCCACAGAATTGAAA- GATCT
			GTAGGTGGAAATTCTAGCAT- CATCC
		ALELO KI	GTAATGACAAGCGCCCAGA ATGCTGCCCATAAGGTATC

Táboa 2. Oligonucleótidos utilizados para o xenotipado dos ratos modificados xeneticamente.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Cultivo primario de MEFs wt, *pRb* ^{-/-}, *p107* ^{-/-}, *p130* ^{-/-}, *i4F* e Sox2-TK

Os fibroblastos embrionarios procedentes de ratos wt, *p107* ^{-/-}, *p130* ^{-/-}, *i4F* e Sox2-TK extraíense de embrións de femias preñadas no estadio E13.5. En cambio, os fibroblastos embrionarios *Rb* ^{-/-} extraíense de embrións nun estadio anterior, o E12.5, xa que estes presentan letalidade embrionaria entre os estadios E13.5 e E15.5. Tras o sacrificio da femia preñada, os embrións extraíense do útero e mantéñense en PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich). Posteriormente extraése cada embrión individual do útero e colócase sobre placas de cultivo celular con PBS 1X/1% Penicilina/Estreptomicina nun ambiente estéril. A continuación retírase a cabeza e os tecidos viscerais de cada un dos embrións e dáselle un lavado con PBS 1X. O resto do embrión disgregase coa axuda de bisturís estériles, engádeselle 1.5 mL de tripsina 1X (Sigma-Aldrich) e incúbase a 37°C cunha atmosfera do 5% de CO₂ durante 5 minutos. Tras a tripsinización engádesse medio de cultivo de fibroblastos e resuspéndese até disociar completamente o tecido. A suspensión celular resultante incúbase durante 5 minutos a temperatura ambiente nun tubo *Falcon* de maneira que os restos do tecido non disgregado se depositan no fondo do tubo e o sobrenadante que contén os fibroblastos pásase a unha nova placa de cultivo de 150 mm con medio fresco. Estes fibroblastos mantéñense durante 2 ou 3 días en cultivo até que están confluentes (Pase 0). Poden conxelarse en alícuotas con medio de conxelación (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Sigma-Aldrich) e 10% de DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, Sigma-Aldrich) ou usarse directamente para os experimentos. En todo caso, os MEFs non se expanden máis alá do Pase 3, para evitar a senescencia replicativa.

Estes MEFs mantéñense en medio de cultivo de fibroblastos que é DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS (Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich).

As cabezas de cada un dos embrións extraídos empréganse para xenotipar cada embrión tal e como mencionamos no apartado 1.6. *Xenotipado*.

2.2. ESCs e iPSCs

As ESCs ou iPSCs mantéñense en cultivo sobre capas de *feeders* (ver o seguinte apartado 2.3. *Preparación de feeders*) con medio de cultivo de ESCs ou iPSCs composto por DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 15% de KSR (*KnockOut™ SR, Serum Replacement for ESCs/iPSCs*, GIBCO by Life Technologies), 1000 U/mL LIF (GIBCO by Life Technologies), 1X de NEAA (*Non-essential amino acids*, GIBCO by Life Technologies), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de Penicilina/Estreptomina (Sigma-Aldrich) e 0.1 mM de 2-mercaptoetanol (GIBCO by Life Technologies).

O medio que se emprega para a conxelación de células ESCs ou iPSCs é medio completo de ESCs/iPSCs con 20% FBS e 10% de DMSO.

2.3. Preparación de *feeders*

Os *feeders* utilízanse como capa alimentadora xa que segregan diversos factores que favorecen o crecemento e o mantemento do estado indiferenciado das ESCs ou iPSCs. Neste caso, empréganse MEFs wt en Pase 3 que se inactivaron mitoticamente mediante o tratamento con Mitomicina C (Inibsa) a unha concentración final de 10 µg/mL durante 2-3 horas. Unha vez tratados, lávanse exhaustivamente con PBS 1X e conxélanse en alícuotas con medio de conxelación (FBS e 10% de DMSO).

Os *feeders* desconxélanse sobre placas con xelatina ao 0.1% en auga destilada (*Gelatin from Bovine*, Sigma-Aldrich) e en medio de fibroblastos o día anterior ao pase das ESCs ou iPSCs.

2.4. Liñas celulares e tratamento

2.4.1. Liñas celulares

A continuación mostramos as liñas celulares empregadas neste traballo:

- **HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*)**: estas células HEK293T derivan orixinalmente de células de ril humano embrionario descritas por primeira vez en 1977 (Graham, F.L. et al., 1977). Trátase de células epiteliais que están transformadas pola oncoproteína viral antixeno *Large-T* (LT) do *Simian Virus 40* (SV40).
- **H1299 (NSCLC, *Human Non Small Cell Lung Carcinoma*)**: trátase dunha liña celular humana de carcinoma de pulmón de célula non pequena derivada de metástase en nódulo linfático (Giaccone, G. et al., 1992). Estas células posúen unha deleción parcial homocigótica do xene TP53 e polo tanto, non expresa a proteína supresora de tumores p53 (Chang, C., 1996).
- **A549 (*Human lung adenocarcinoma*)**: é unha liña celular humana de adenocarcinoma epitelial de pulmón derivada por primeira vez en 1972 (Giard, D.J. et al., 1973). Estas células teñen un estado de p53 wt (Jia, L.Q. et al., 1997).

- **U-373MG (Uppsala-373 Malignant Glioma):** tratase de células dun astrocitoma-glioblastoma humano derivado dun tumor maligno (Pontén, J. and Macintyre, E.H., 1968). No xene TP53 presentan unha mutación no codón 273 (R273H) polo que expresan unha proteína p53 mutante non funcional (Van Meir, E.G. et al., 1994).
- **U-87MG (Uppsala-87 Malignant Glioma):** é unha liña celular de glioblastoma humano derivada dun glioma maligno (Pontén, J. and Macintyre, E.H., 1968). Estas células teñen un estado de p53 wt (Van Meir, E.G. et al., 1994).
- **T653 (Mouse glioblastoma cell line):** liña celular de glioblastoma de rato que expresa de maneira ectópica HRas^{V12} oncoxénico e presenta un estado de p53 wt, xerada no laboratorio do Dr. Jose A. Costoya (Seoane, M. et al., 2008).
- **T731 (Mouse glioblastoma cell line):** liña celular de glioblastoma de rato que expresa de maneira ectópica HRas^{V12} oncoxénico, é KO para Rb e presenta un estado de p53 wt, xerada no laboratorio do Dr. Jose A. Costoya (Seoane, M. et al., 2008).
- **MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7):** liña celular de adenocarcinoma de mama humano que se illou por primeira vez en 1970 (Soule, H.D. et al., 1973). Estas células teñen un estado de p53 wt (Wasielewski, M. et al., 2006).

Todas as liñas celulares cultiváronse en DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS (Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich).

O subcultivo, o recuento celular e a conxelación ou desconxelación tanto dos cultivos primarios como das liñas celulares realízanse seguindo procedementos estándar de cultivo celular.

2.4.2. Tratamentos

A continuación mostramos os tratamentos empregados neste traballo:

- **Doxiciclina (Sigma-Aldrich):** a doxiciclina é un antibiótico do grupo das tetraciclinas que actúa por inhibición da síntese de proteínas e bloquea a unión do RNA de transferencia ao complexo ribosómico do RNA mensaxeiro. Neste traballo, as células que foron co-transducidas con pLV-tetO-Sox2, un vector lentiviral inducible que contén un promotor dependente de tetraciclina (TetOP) seguido da rexión que codifica para Sox2 e co vector FUW-M2rtTA, un transactivador reverso dependente de tetraciclina, foron tratadas con 20 ng/mL de doxiciclina para levar a cabo a indución da expresión de Sox2.
- **Doxorrubicina (TEDEC):** a doxorrubicina é un axente quimioterápico que induce roturas de dobre cadea no DNA (Thorn, C.F. et al., 2011) o que provoca a inducción dunha resposta de dano a DNA que desemboca na activación de p53 (Breen, L. et al., 2007). Neste caso, as liñas celulares de glioblastoma de rato T653 e T731 foron tratadas con 0.5 µg/mL de Doxorrubicina durante 4, 6, 8 e 10 horas. Ambas liñas celulares transducidas cun shRNA contra p53 (shp53)

ou o vector baleiro tamén foron tratadas con 0.5 µg/mL de Doxorrubicina durante 10 horas.

- **HBSS (Sigma-Aldrich):** a función esencial da solución de HBSS é manter o pH así como o balance osmótico. Tamén proporciona auga e ións inorgánicos esenciais ás células. As células iPSCs Sox2^{WT} e iPSCs Sox2^{TK} foron tratadas con HBSS durante 6 días.
- **Ganciclovir (Cymevene 500 mg, Roche):** o ganciclovir é un análogo sintético da 2'-desoxiguanosina que inhibe a replicación dos virus herpéticos *in vitro* e *in vivo*. Para exercer a súa actividade antivírica, o ganciclovir é fosforilado a monofosfato por unha proteína quinasa do virus. Seguidamente, o monofosfato convertese a di- e tri-fosfato polas quinases celulares. Unha vez formado o trifosfato de ganciclovir, este permanece como tal nas células infectadas durante varios días. Crese que o ganciclovir trifosfato inhibe a síntese do virus mediante unha inhibición competitiva das DNA-polimerasas víricas e, tamén incorporándose ao DNA do virus, co que finaliza prematuramente a elongación do DNA vírico. Neste caso, as células iPSCs Sox2^{WT} e iPSCs Sox2^{TK} foron tratadas con 0.25 µg/mL de GCV durante 6 días.

3. ELABORACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

3.1. Microorganismos utilizados e medios de cultivo de bacterias

3.1.1. Microorganismos utilizados

Os microorganismos empregados para as transformacións realizadas neste traballo foron as bacterias *E.coli* DH5α (F-*endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ-*) e STBL2 (F-*endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) λ-*). Ambos microorganismos foron transformados mediante un choque térmico.

3.1.2. Medios de cultivo de bacterias

3.1.2.1. Medio líquido

O medio de cultivo bacteriano que se empregou para o crecemento, mantemento e selección das cepas bacterianas foi o medio LB (*Luria-Broth*), que está formado por triptona 1% (Becton Dickinson, BD), extracto de fermento 0.5% (BD) e NaCl 0.5% (Sigma-Aldrich) en auga destilada. Posteriormente, o medio suplementouse co antibiótico axeitado segundo a resistencia que confira o plásmido (100 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich) ou 50 µg/mL de Kanamicina (GIBCO by Life Technologies)).

3.1.2.2. Medio sólido

O medio de cultivo bacteriano sólido preparase en placas Petri e está formado por medio LB (triptona 1%, extracto de fermento 0.5% e NaCl 0.5% en auga destilada) suplementado con 1.5% de LB Agar (Sigma-Aldrich). Ao igual que o medio

MATERIAL E MÉTODOS

líquido, as placas suplementáronse co antibiótico axeitado segundo a resistencia que confira o plásmido (100 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich) ou 50 µg/mL de Kanamicina (GIBCO by Life Technologies) e deixáronse solidificar.

3.2. Obtención do DNA plasmídico

3.2.1. Minipreps

Co obxectivo de obter DNA plasmídico a pequena escala, previamente realízase un minicultivo onde unha colonia illada é picada da placa de LB e deixase crecer en 2 mL de LB co seu antibiótico correspondente nun tubo *Falcon* a 37°C, 180 rpm durante toda a noite. Posteriormente, o DNA plasmídico é purificado empregando o método de lise alcalina con algunhas modificacións descrito por Birnboim, H.C. and Doly, J., 1979.

3.2.2. Midipreps

Se se quere obter unha maior cantidade de DNA plasmídico, as bacterias transformadas crécese en 250 mL de LB co seu antibiótico correspondente nun tubo *Falcon* a 37°C, 180 rpm durante toda a noite e purifícase o DNA empregando o Kit *Genopure Plasmid Midi* (Roche), seguindo as instrucións do fabricante.

3.2.3. Maxipreps

Se o obxectivo é obter unha cantidade a grande escala de DNA plasmídico, crecemos as bacterias transformadas nun maior volume de medio LB (500 mL) nas condicións de crecemento anteriormente citadas e recupérase o DNA empregando o Kit *QIAfilter™ Plasmid Maxi* (Qiagen), seguindo as instrucións do fabricante.

3.3. Cuantificación da concentración do DNA

A cuantificación da concentración de DNA plasmídico realizouse empregando o *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). Utilizouse a relación de absorbancia a 260 nm e 280 nm para avaliar a pureza do DNA plasmídico. Unha relación de aproximadamente 1.8 aceptase como DNA puro.

3.4. Comprobación do DNA plasmídico

3.4.1. Dixestión con encimas de restrición

Unha vez que purificamos e cuantificamos o DNA plasmídico, realízase unha dixestión con encimas de dixestión para comprobar se o plásmido purificado é o de interese. En todos os casos, pártese de 100 ng de DNA plasmídico e séguense as condicións de reacción recomendadas pola casa comercial (Nzytech) para cada encima utilizada.

3.4.2. Eletroforese en xel de agarosa

Os fragmentos lineais de DNA obtidos da dixestión encimática sepáranse, identifícanse e caracterízanse mediante electroforese en xeles de agarosa de diferen-

tes porcentaxes (0.5% ao 2%) segundo o tamaño do fragmento a separar. Os xeles de agarosa (Conda) preparáronse en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 2mM) e as mostras en tampón de carga 6X (glicerol 30% (Sigma-Aldrich) e 2.5 g/L azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) en auga destilada) a unha concentración final de 1X. O RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology) permitiu visualizar os fragmentos de DNA no transiluminador de luz ultravioleta UVP Bio-Doc-It™ Imaging System. Utilizáronse dous marcadores de DNA, o GeneRuler 1Kb DNA ladder (Thermo Scientific) e o NZYDNA ladder V (Nzytech).

3.5. Plásmidos

A continuación mostramos unha táboa (**Táboa 3**) onde se recollen todos os plásmidos que purificamos e utilizamos neste traballo:

PLÁSMIDO	REFERENCIA
pCL-Eco (Addgene #12371)	Naviaux, R.K. et al., 1996
pHCMV-AmphoEnv (Addgene #15799)	Sena-Esteves, M. et al., 2004
pBabe puro IRES-EGFP (Addgene #14430)	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor L. Miguel Martins.
pLP1 (ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix, Invitrogen, K497500)	Comercial
pLP2 (ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix, Invitrogen, K497500)	Comercial
pLVSVG (ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix, Invitrogen, K497500)	Comercial
psPAX2 (Addgene #12260)	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Didier Trono.
FUGW (Addgene #14883)	Lois, C. et al., 2002
pmaxGFP (The Nucleofector® Kit, Lonza)	Comercial
pRetroSuper-puro	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Reuven Agami.
pRetroSuper-puro-shp53	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Reuven Agami.
Ef1a_Large T-antigen_Ires_Puro (Addgene #18922)	Mali, P. et al., 2008
pMXs-Oct3/4 (Addgene #13366)	Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006
pMXs-Klf4 (Addgene #13370)	Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006
pMXs-Sox2 (Addgene #13367)	Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006
pMXs-Sox2-IP (Addgene #15919)	Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006
PL-SIN-EOS-C(3+)-EiP (Addgene #21313)	Hotta, A. et al., 2009
pcDNA3 (Invitrogen)	Comercial
pcDNA3-p53	Rodriguez, M.S. et al., 1999

pRetroSuper-Blast	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Reuven Agami.
pRetroSuper-Blast-shp53	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Reuven Agami.
pGL3-Basic (Promega, E1751)	Comercial
PG13-luc (wt p53 binding sites) (Addgene #16442)	el-Deiry, W.S. et al., 1993
pGL3-Sox2 luc	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Richard G. Pestell.
pBP-lacZ (Addgene #72948)	Moore, S.J. et al., 2016
MSCV PIG (Puro IRES GFP) (Addgene #18751)	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Scott W Lowe.
MSCV PIG-shp53 (Puro IRES GFP)	Non publicado. Xerado no laboratorio do doutor Scott W Lowe.
pLV-tetO-Sox2 (Addgene #19765)	Stadtfeld, M. et al., 2008
FUW-M2rtTA (Addgene #20342)	Hockemeyer, D. et al., 2008

Táboa 3. Listado dos distintos plásmidos que foron purificados e utilizados neste traballo.

4. TRANSFECCIÓN CELULAR

A transfección celular é un proceso que consiste na introdución de material xenético externo en células eucariotas mediante vectores non virais ou virais. Neste traballo empregamos dous métodos diferentes de transfección celular:

4.1. Transfección celular mediante o método de precipitación con fosfato cálcico

Para realizar os experimentos de reprogramación celular a liña celular HEK293T foi transfectada mediante o método de precipitación con fosfato cálcico (Wigler, M. et al., 1979) co obxectivo de obter sobrenadantes retrovirais ou lentivirais para unha posterior transdución, seguindo o protocolo que detallamos a continuación:

- Sementase 3×10^6 células HEK293T en cada placa de cultivo de 100 mm de diámetro e déixanse crecer durante 24 horas aproximadamente até chegar á confluencia necesaria para realizar a transfección.
- Ao día seguinte, dúas horas antes de realizar a transfección emprázase o medio de cultivo por medio fresco.
- Transcorridas as dúas horas, prepáranse as mesturas para realizar a transfección das células HEK293T. Por un lado, prepárase unha mestura que contén 10 μg de DNA en 250 μl de auga destilada e 250 μl de CaCl_2 0.5 M (Acros Organics) nun tubo *eppendorf*. Posteriormente, nun tubo *Falcon* engádense 500 μl de HeBS 2X (*Hepes-buffered saline solution* 2X) formado por 280 mM NaCl, 50

mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄ en auga destilada a pH 7.0. A continuación, engádese a primeira mestura de DNA en auga destilada e CaCl₂ lentamente gota a gota sobre o HeBs 2X, mentres se producen burbullas cunha pipeta pasteur (Fisher Scientific).

- Unha vez rematada a mestura, dar un vórtex, incubar 20 minutos a temperatura ambiente e engadir ás células abarcando toda a superficie das mesmas.
- Ao día seguinte, realízase un lavado con PBS 1X e cambiase o medio de cultivo por medio fresco.

As combinacións de plásmidos (DNA) que se empregaron para os experimentos de reprogramación foron as seguintes:

- 5 µg pMX-Oct4 + 5 µg pCL-Eco
- 5 µg pMX-Sox2 + 5 µg pCL-Eco
- 5 µg pMX-Klf4 + 5 µg pCL-Eco
- 5 µg PLSIN-EOS-C(3+)-EiP + 4 µg psPAX2 + 1 µg pLVSVG

4.2. Transfección celular mediante o método de transfección con Polietilenimina (PEI)

Para realizar o resto de experimentos deste traballo as liñas celulares mencionadas anteriormente foron transfectadas mediante o método de transfección con PEI (Boussif, O. et al., 1995), tal e como se detalla a continuación:

- Sementase o número necesario de células segundo o tipo celular ou tamaño da placa de cultivo que se queira transfectar e déixanse crecer durante 24 horas aproximadamente até chegar á confluencia necesaria para realizar a transfección.
- Para realizar a transfección realízanse dúas mesturas independentes:
 - Por un lado engádese o PEI 1 mg/mL (Polysciences) a medio sen suplementar (sen FBS, L-glutamina e Penicilina/Streptomicina) nunha relación 1:6 DNA:PEI nun tubo *eppendorf*.
 - Noutro tubo *eppendorf* engádense os µg de plásmidos necesarios segundo o tamaño da placa de cultivo que se queira transfectar en medio sen suplementar.
- Posteriormente, xúntanse os dous tubos *eppendorf*, dáselle un vortex e incúbase durante 10 minutos a temperatura ambiente. Neste tempo de incubación cámbiase por medio fresco o medio de cultivo das células sementadas o día anterior.
- Unha vez transcorridos os 10 minutos de incubación, engádese o contido do tubo *eppendorf* a cada placa de cultivo celular.
- Ás 8 horas aproximadamente, realízase un lavado con PBS 1X e cambiase o medio de cultivo por medio fresco.

5. TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL E LENTIVIRAL

A transducción celular consiste na introdución de ácidos nucleicos externos en células eucariotas mediante partículas retrovirais ou lentivirais. Para realizar a transducción retroviral e lentiviral séguese o protocolo que detallamos a continuación:

- As células HEK293T son transfectadas mediante o método de precipitación con fosfato cálcico ou PEI segundo describimos anteriormente cos correspondentes vectores retrovirais ou lentivirais:
 - **Transducción retroviral:** o plásmido de interese máis o plásmido empaquetador retroviral (pCL-Eco ou pCL-Ampho) nunha proporción 1:1. O plásmido pCL-Eco expresa os xenes *gag/pol/env* e a proteína env codificada por este plásmido confire tropismo por só células de rato e rata. O pCL-Ampho expresa os xenes *gag/pol/env* e a proteína env codificada por este plásmido confire tropismo pola maioría das células de mamífero (non por células de hámster).
 - **Transducción lentiviral:** o plásmido de interese máis os plásmidos empaquetadores lentivirais de primeira xeración (pLP1 + pLP2 + pLVSVG) nunha proporción 1:(1:1:1). O plásmido pLP1 codifica os xenes HIV-1 *gag/pol*, o pLP2 o xene HIV-1 *rev* e o pLVSVG expresa a glicoproteína G do virus da estomatite vesicular. Tamén se empregaron plásmidos empaquetadores lentivirais de segunda xeración como o pSPAX2 que codifica para os xenes *gag/pol/rev/tat* xunto co pLVSVG que expresa a glicoproteína G do virus da estomatite vesicular. Neste caso o plásmido de interese máis os plásmidos empaquetadores lentivirais de segunda xeración utilízanse nunha proporción 1:(0,8:0,2).
- Ás 48 horas da transfección os sobrenadantes retrovirais ou lentivirais procedentes das células HEK293T filtranse en filtros de 0.45 μm (Jet Biofil) e engádenselle Polybrene (*Hexadimethrine bromide*, Sigma-Aldrich) a unha concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ para incrementar a eficiencia do proceso de transducción. Posteriormente, estes sobrenadantes filtrados introdúcense nas células a transducir que foron sementadas 24 horas antes. Este procedemento repítese cada 12 horas para realizar finalmente un total de 3 roldas de transducción, sendo emprazado de cada vez o medio das células HEK293T por medio fresco.
- Ás 12 horas da terceira rolda de transducción, cambiar o medio de cultivo das células transducidas por medio fresco e comezar a selección engadindo o antibiótico (**Táboa 4**) correspondente segundo a resistencia que confira o plásmido.

ANTIBIÓTICO	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN	TEMPO (días)
Puromicina	Millipore	1-3 µg/mL	3
G418, Geneticin	Sigma-Aldrich	1 mg/mL	15
Blasticidina S	Sigma-Aldrich	10 µg/mL	6

Táboa 4. Listado de antibióticos de selección.

6. REPROGRAMACIÓN CELULAR

6.1. Reprogramación celular a iPSCs

Os experimentos de reprogramación celular realizáronse co-transducindo 1.4×10^6 MEFs wt, Sox2-TK, Rb -/-, p107 -/- e p130 -/- de Pase 1-2, por placa de cultivo de 100 mm cos sobrenadantes retrovirais ou lentivirais procedentes de células HEK293T transfectadas cos vectores retrovirais pMXs-Oct4, pMXs-Klf4, pMXs-Sox2 en combinación de 3 (Oct4, Klf4, e Sox2) ou 2 (Oct4 e Klf4) factores ou co plásmido lentiviral PLSIN-EOS-C(3+)-EiP mediante o método de precipitación con fosfato cálcico explicado no apartado 4.1. *Transfección celular mediante o método de precipitación con fosfato cálcico*. Tras a co-transdución, o medio de cultivo de fibroblastos emprazouse por medio de iPSCs cada dous días durante a reprogramación celular (14 días).

6.2. Tinguidura Fosfatasa Alcalina (AP, *Alkaline Phosphatase*) das colonias iPSCs

As ESCs e iPSCs expresan niveis altos da encima AP, converténdose esta nun marcador clave para a identificación do estado pluripotente. Aos 14 días do proceso de reprogramación celular, realízase a tinguidura AP co obxectivo de detectar as colonias iPSCs xeradas. Para isto, as colonias iPSCs fíxanse con formaldehído (EMS, *Electron Microscopy Sciences*) ao 4% en PBS 1X durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a actividade AP é detectada colorimetricamente empregando o Kit comercial BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium) *Color Development Substrate* (Promega) seguindo as instrucións do fabricante.

6.3. Visualización das colonias iPSCs co plásmido repoteiro de pluripotencia PLSIN-EOS-C(3+)-EiP

As colonias iPSCs emerxentes durante o proceso de reprogramación celular visualizáronse mediante a expresión de GFP procedente do repoteiro de pluripotencia PLSIN-EOS-C(3+)-EiP empregando o microscopio Axio Vert.A1 Microscope (Zeiss).

6.4. Picado e expansión de colonias iPSCs

Aos 14 días do proceso de reprogramación celular todas as colonias foron picadas e expandidas en condicións de cultivo de células nai. Antes do picado de colonias, o medio das células iPSCs emprazouse 3 horas antes por medio de cultivo

fresco. O picado de colonias realizouse empregando o microscopio óptico *Primo Vert Microscope* (Zeiss) nun ambiente estéril, de maneira que cada unha das colonias é recollida en 10 µl de medio e transferida individualmente a un tubo *Eppendorf* de 0.2 mL ao que se lle engade 30 µl de tripsina 1X. Tras a tripsinización das colonias 5 minutos no incubador (Mettler) engádense 70 µl de medio de iPSCs a cada tubo para neutralizar a acción da tripsina. Unha vez que as colonias están totalmente disgregadas, o contido de cada un dos tubos sementase nun pozo dunha placa de p96 pozos (Corning) con *feeders* sobre xelatina ao 0.1%, ao que previamente se lle mudou o medio de fibroblastos por 100 µl de medio de iPSCs. O medio de iPSCs cambiouse diariamente até que as células alcanzaron unha confluencia do 80-90 % e se volveron a tripsinar e expandir a placas de maior tamaño con *feeders* sobre xelatina ao 0.1%, até chegar a placas de 100 mm. Unha vez que as colonias están en placas de 100 mm, expándese a poboación, conxélanse alícuotas en medio de cultivo de iPSCs e empréganse para os diferentes ensaios realizados neste traballo, como son a caracterización das colonias iPSCs mediante Western blot e qRT-PCR e o ensaio de diferenciación *in vitro* a corpos embrioides (EBs, *Embryoid Bodies*).

6.5. Ensaio de diferenciación *in vitro* das iPSCs a EBs

Para demostrar a capacidade pluripotente das células iPSCs obtidas realizouse un ensaio de diferenciación *in vitro* que consiste na formación de EBs. A técnica empregada para a formación de EBs denomínase gota colgante ou “*hanging drop*”. Para isto, as células iPSCs tripsinízanse e cóntanse de maneira que se prepara unha suspensión celular a unha densidade de 2.5×10^5 células/mL en medio de cultivo de EBs (DMEM suplementado con 10% FBS, 1X de NEAA, 1% L-Glutamina, 1% Estreptomicina/Penicilina e 0.1 mM 2-mercaptoetanol). Posteriormente, sobre a tapa dunha placa *Petri* depositáanse gotas de 20 µl da suspensión celular, tendo finalmente unha media de 50 gotas colgantes na tapa da placa cultivadas sobre o prato da placa *Petri* cuberto de PBS 1X. Aos tres días, as gotas colgantes recóllen-se con medio de EBs e pásanse a unha placa *Petri* con medio de cultivo fresco. Os EBs formados mantéñense en cultivo durante 15 días emprazándolles o medio cada 3 días. Tras 15 días en cultivo, os EBs recóllense para analizar marcadores de diferenciación das tres capas xerminais, endodermo (*Gata4*), mesodermo (*Nkx2.5*) e ectodermo (*Dlx3*) mediante qRT-PCR e realizar unha análise histolóxica de diferenciación de cada unha das estruturas xeradas dentro dos EBs. Para isto último, os EBs incluíronse en agar (Sigma-Aldrich) ao 2.5% en PBS 1X, fixéronse en formol (Panreac AppliChem) e embebéronse en parafina (Millipore). Posteriormente realizáronse cortes de 5 µm de espesor e tinguíronse coa tinguidura Hematoxilina-Eosina (H&E).

7. ANÁLISE DA EXPRESIÓN DE RNA

7.1. Extracción e cuantificación dos extractos de RNA

Para analizar a expresión de RNA, extraese RNA total a partir dos cultivos celulares e tecidos mediante o Kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel), seguindo as indicacións do fabricante. No caso da extracción de RNA a partir de tecido, 20-30 mg de tecido foron disgregados anteriormente no TissueLyser II (Qiagen) durante 3 minutos a 30 Hz en tubos de plástico Eppendorf con feche de seguridade (Safe-Lock Tubes 2.0 mL, Eppendorf Quality) cunha bola de aceiro inoxidable. A cuantificación dos extractos de RNA obtidos realizouse empregando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Utilizouse a relación de absorbancia a 260 nm e 280 nm para avaliar a pureza do RNA plasmídico. Unha relación de aproximadamente 2.0 aceptase como RNA puro.

7.2. Análise dos extractos de RNA por PCR cuantitativa a tempo real (qRT-PCR, *quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*)

7.2.1. Síntese de cDNA por retrotranscrición

Unha vez extraído o RNA, realizase a reversotranscrición a partir de 2 µg de RNA para obter o cDNA. Para iso, empregamos o Kit High-Capacity cDNA ReverseTranscription (Applied Biosystems), no que aos 2 µg de RNA se lle engade unha mestura cos seguintes compoñentes: RT Buffer 1X, 4 mM de dNTP Mix, Random Primers 1X e 50 U de MultiScribe™ Reverse Transcriptase nun volume final de reacción de 20 µl en auga libre de nucleasas. A continuación séguese o programa de PCR que indica o protocolo da casa comercial. O termociclador utilizado é o MultiGene™ OptiMax (Labnet).

7.2.2. qRT-qPCR mediante SYBR Green

Unha vez obtido o cDNA tras a reversotranscrición, realizase unha qRT-PCR con SYBR Green para determinar os niveis de expresión de mRNA dos xenes de interese. Para iso, pártese de 33 ng de cDNA ao que se lle engade unha mestura formada polos oligonucleótidos Forward e Reverse a unha concentración de 0.25 µM, SYBR Green Power PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems) e auga libre de nucleasas para un volume final reacción de 12 µl/pozo. Todas as reaccións realízanse por triplicado para cada xene e a cantidade relativa de mRNA normalízase usando o *housekeeping Gapdh*. Para realizar a qRT-PCR utilízanse os equipos Mx3005P e AriaMx Real-Time PCR systems (Agilent technologies). Na **Táboa 5** está a secuencia de cada un dos oligonucleótidos que se utilizan para detectar a expresión dos xenes. Os resultados analizáronse cos softwares MxPro qPCR 4.10 e AriaMx 1.0 (Agilent technologies).

OLIGONUCLEÓ- TIDOS	SECUENCIA 5'→ 3'	CASA COMERCIAL
mSox2 endógeno	Forward: TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA Reverse: TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	Eurofins Genomics
mOct4 endógeno	Forward: TCTTTCCACCAGGCCCGGCTC Reverse: TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	Eurofins Genomics
mKlf4 endógeno	Forward: GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC Reverse: TCGCTTCCTCTTCCTCCGACACA	Eurofins Genomics
mNanog endógeno	Forward: AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG Reverse: CAACCACTGGTTTTCTGCCACCG	Eurofins Genomics
mSox2 total	Forward: GGTTACCTCTTCCTCCCACTCCAG Reverse: TCACATGTGCGACAGGGGCA	Eurofins Genomics
mGapdh	Forward: TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG Reverse: GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC	Eurofins Genomics
mNkx2.5	Forward: TTACCCGGGAGCCTACGGTG Reverse: GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGC	Eurofins Genomics
mDlx3	Forward: GCTCCTCAGCATGACTACTACT Reverse: CTGCGAGCCCATTGAGATTG	Eurofins Genomics
mGata4	Forward: CCCTACCCAGCCTACATGG Reverse: ACATATCGAGATTGGGGTGTCT	Eurofins Genomics
mTrp53	Forward: TGAAACGCCGACCTATCCTTA Reverse: GGCACAAACACGAACCTCAAA	Eurofins Genomics
mCdkn1a	Forward: GTGGGTCTGACTCCAGCCC Reverse: CCTTCTCGTGAGACGCTTAC	Eurofins Genomics
mInk4a	Forward: CGTACCCCGATTGAGGTGAT Reverse: TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT	Eurofins Genomics
mInk4b	Forward: AGATCCCAACGCCCTGAAC Reverse: CCCATCATCATGACCTGGATT	Eurofins Genomics
mIl6	Forward: GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA Reverse: CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	Eurofins Genomics
mCxcl1	Forward: CTGGGATTCACCTCAAGAACATC Reverse: CAGGGTCAAGGCAAGCCTC	Eurofins Genomics
mMmp1	Forward: CCTCGTTGGACCAAAACACA Reverse: GCGATGGCATCTTCCACAA	Eurofins Genomics
mMmp3	Forward: CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA Reverse: TTCAGCTATTTGCTTGGGAAA	Eurofins Genomics

mSerpine1	Forward: TTGAATCCCATAGCTGCTT Reverse: GACACGCCATAGGGAGAGA	Eurofins Genomics
mTimp1	Forward: CGGAAATTTGCACATCAGTG Reverse: GACCTGATCCGTCCACAAAC	Eurofins Genomics
hTP53	Forward: CCGCAGTCAGATCCTAGCG Reverse: AATCATCCATTGCTTGGGACG	Eurofins Genomics
hCDKN1A	Forward: CCTGTAAGTGTCTGTACCCT Reverse: GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	Eurofins Genomics
hSOX2 endógeno	Forward: GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG Reverse: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	Eurofins Genomics
hGAPDH	Forward: TCCATGACAACCTTGGCATCGTGG Reverse: GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC	Eurofins Genomics

Táboa 5. Oligonucleótidos utilizados na qRT-PCR.

7.2.3. qRT-PCR mediante sondas *Taqman*

Nuns experimentos específicos, a partir do cDNA, realízase unha qRT-PCR na que utilizamos sondas *Taqman*. Neste tipo de qRT-PCR pátrese de 50 ng de cDNA ao que se lle engade unha mestura composta pola sonda *Taqman* Assay 1X (Thermo Scientific), *GoTaq Probe qPCR Master Mix* 1X (Promega) e auga libre de nucleasas para un volume final de reacción de 20 µl/pozo. Todas as reaccións realízanse por triplicado para cada xene e a cantidade relativa de mRNA normalízase usando o *housekeeping* mUbc ou hGAPDH. Para realizar esta qRT-PCR utilízase o equipo *StepOne™* e *StepOnePlus™* PCR Real-Time System (Applied Biosystems). Na **Táboa 6** amósanse as sondas *Taqman* específicas para cada un dos xenes que se utilizan. Os resultados analizáronse co software *StepOne™* 2.2 (Applied Biosystems).

XENE	ASSAY ID	CASA COMERCIAL
mSox2	Mm03053810_s1	Thermo Scientific
mNanog	Mm02384862_g1	Thermo Scientific
mUbc	Mm01198158_m1	Thermo Scientific
hCDH1	Hs00170423_m1	Thermo Scientific
hVIM	Hs00958116_m1	Thermo Scientific
hSNAIL1	Hs00195591_m1	Thermo Scientific
hSNAIL2	Hs00950344_m1	Thermo Scientific
hTWIST1	Hs00361186_m1	Thermo Scientific
hGAPDH	Hs99999905_m1	Thermo Scientific

Táboa 6. Sondas *Taqman* utilizadas na qRT-PCR.

8. ANÁLISE DA EXPRESIÓN PROTEICA

8.1. Obtención de extractos proteicos

A extracción das proteínas realizouse seguindo o protocolo que describimos a continuación:

- Retírase o medio de cultivo das células e realízanse dous lavados con PBS 1X frío (Sigma-Aldrich).
- Tripsinízanse as células con tripsina 1X (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos a 37°C no incubador.
- Engádense os mL de medio de cultivo necesarios para neutralizar a tripsinización.
- Posteriormente, pasase a suspensión celular a un tubo *Falcon* e centrífugase a 900 rpm durante 5 minutos a 37°C na centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific).
- Unha vez centrifugado, elimínase o sobrenadante e resuspéndese o pellet celular en 1 mL de PBS 1X, que se pasa a un tubo *Eppendorf*.
- Logo centrífugase a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Elimínase o sobrenadante e resuspéndese o pellet celular en tampón RIPA 1X (*Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer*) composto por 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% Deoxicolato de sodio xunto cos inhibidores de proteasas (1 mM Ortovanadato sódico, 1mM PMSF, 1mM DTT, 4 mM de NaF e 1X do cóctel de inhibidores proteicos).
- Deixase o pellet celular resuspendido no volume apropiado de tampón RIPA 1X 20 minutos en xeo.
- Unha vez transcorridos os 20 minutos, sonícanse as mostras cunha amplitude de onda do 30% aplicándolle 3 pulsos de 5 segundos cada un.
- Por último, centrífanse as mostras xa lisadas a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C e transfírense os sobrenadantes proteicos a novos tubos *Eppendorf*.

8.2. Cuantificación dos extractos proteicos mediante o método de Bradford

A cuantificación dos extractos proteicos realizouse seguindo o método descrito por Bradford (Bradford, M.M., 1976). Para isto, empregamos o *Kit DC Protein Assay* (BIO-RAD) e medise a absorbancia nun espectrofotómetro para microplacas compacto *Epoch2* (BioTek) a 750 nm. A recta patrón de calibrado realizouse a partir de concentracións coñecidas de BSA (*Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich).

8.3. Análise dos extractos proteicos mediante Western blot

Unha vez cuantificados os extractos proteicos procedese a realizar a preparación das mostras. Para preparar as mostras empréganse 40 µg de proteína total,

o tampón de carga (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% de azul bromofenol e 125 mM Tris-HCl pH 6.8) a unha concentración 1X en auga destilada. A continuación ferve as mostras a 95°C durante 5 minutos nun *termoblot* (*Thermomixer Compact*, Eppendorf).

As mostras proteicas xa preparadas sepáranse por electroforese vertical co equipo *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO-RAD) en xeles de poliacrilamida, seguindo o método descrito por Laemmli (Laemmli, U.K., 1970). Os xeles de poliacrilamida teñen dúas fases, o xel concentrador ou *stacking* ao 4% (4% acrilamida/bisacrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.08% TEMED en auga destilada) onde se concentra a mostra e o xel separador ao 12 % neste caso (12% acrilamida/bisacrilamida, 372 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.075 % APS, 0.04 % TEMED en auga destilada) onde se separan as proteínas en función do seu tamaño. O marcador de peso molecular que se empregou foi *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

Posteriormente, as proteínas separadas mediante electroforese transfírense a unha membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, *Immobilon®-P Transfer Membrane*, Millipore) de 0.45 µm activada previamente en metanol mediante un equipo de transferencia húmida (*Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell*, BIO-RAD) a 100 voltios durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, a membrana é bloqueada con leite ao 5% en TTBS (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente en axitación. Unha vez bloqueada, a membrana incúbase a 4°C durante toda a noite en axitación cos anticorpos primarios (**Táboa 7**). Ao día seguinte, incúbase cos correspondentes anticorpos secundarios conxugados á encima HRP (*Horseradish Peroxidase*) (**Táboa 8**) durante unha hora a temperatura ambiente e en axitación. A inmunodetección mediante este sistema quimioluminiscente realizouse empregando o *Kit Pierce® ECL Western Blotting* (Thermo Scientific) mediante exposición autoradiográfica.

ANTICORPOS PRIMARIOS

ANTICORPO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL	HÓSPEDE	REACTIVIDADE	DILUCIÓN
Sox2 (Y-17)	sc- 17320	Santa Cruz	goat	human,mouse ,rat	1:500
Oct-3/4 (H-134)	sc-9081	Santa Cruz	rabbit	human,mouse ,rat	1:500
Nanog	AB 5731	Millipore	rabbit	human,mouse ,rat	1:5000
Actina (Clone C4)	0869100	MP Biomedicals	mouse	mammals, yeast, fungi	1:1000
p53 (FL-393)	sc-6243	Santa Cruz	rabbit	human,mouse ,rat	1:500
p53 (1C12)	#2524	Cell Signaling	mouse	human,mouse ,rat, hamster, monkey	1:1000
p21 (F-5)	sc-6246	Santa Cruz	mouse	human,mouse ,rat	1:500
E-cadherina (HECD-1)	ab1416	Abcam	mouse	human	1:1000
Vimentina (Clone V9)	M0725	Dako	mouse	human,cow, dog, hamster, horse, monke, rabbit, rat,rat kangaroo	1:1000

Táboa 7. Anticorpos primarios empregados en Western blot.

ANTICORPOS SECUNDARIOS

INMUNOESPECIFICIDADE	REFERENCIA	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Goat IgG-HRP	31402	Thermo Scientific	1:1000
Mouse IgG-HRP	NA931V	GE Healthcare	1:2000
Rabbit IgG -HRP	7074	Cell Signaling	1:1000

Táboa 8. Anticorpos secundarios empregados en Western blot.

9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation*)

Para identificar a unión das proteínas *pocket* ao *enhancer* SRR2 e de p53 ao promotor de Sox2 e os *enhancers* SRR1 e SRR2, realizouse un ensaio de inmunoprecipitación de cromatina. Para levar a cabo este ensaio, as células foron cultivadas en 5 placas de 150 mm até alcanzar o 90% de confluencia e fixadas tras a adición de 1/10 da solución de fixación (0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 50 mM Hepes pH 8.0 e 11% formaldehído) ao medio de cultivo durante 15 minutos en axitación a temperatura ambiente. Posteriormente detívose a actividade da solución fixadora mediante a adición de glicina (Fisher Scientific) a unha concentración final de 0.125 M durante 5 minutos en axitación a temperatura ambiente. Unha vez fixadas, as células foron lisadas en 1 mL de tampón de inmunoprecipitación (0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM Tris- HCl pH 7.5, 150 mM NaCl e inhibidores proteicos) e sonicadas durante 50 minutos no sonicador Covaris S2. Para realizar cada inmunoprecipitación utilizáronse 150 µg de cromatina diluída no tampón de dilución (1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA e 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 e inhibidores proteicos) e preclareada con esferas proteicas de Sefarosa G previamente bloqueadas (GE Healthcare). Neste momento unha alícuota de 50 µg de cromatina reservouse como *input*. Posteriormente, a mostra preclareada incubouse con 3 µg do anticorpo correspondente (**Táboa 9**) durante toda a noite a 4°C en axitación.

ANTICORPO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL	HÓSPEDE	REACTIVIDADE
Rb (C-15)	sc-50	Santa Cruz	<i>rabbit</i>	human,mouse ,rat
p107 (C-18)	sc-318	Santa Cruz	rabbit	human,mouse ,rat
p130 (C-20)	sc-317	Santa Cruz	<i>rabbit</i>	human,mouse ,rat
p53 (FL-393)	sc-6243	Santa Cruz	<i>rabbit</i>	human,mouse ,rat
normal rabbit IgG	sc-2027	Santa Cruz	<i>rabbit</i>	mouse,goat,chicken, rat,hamster, canine, guinea pig,sheep

Táboa 9. Anticorpos empregados no ChIP.

Estes complexos inmunes formados foron precipitados con esferas proteicas de Sefarosa G previamente bloqueadas e lavados de maneira secuencial co tampón de lavado baixo en sales (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl), tampón de lavado alto en sales (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2

MATERIAL E MÉTODOS

mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl), tampón de lavado LiCl (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1) e por último co tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). O DNA inmunoprecipitado foi diluído no tampón de elución (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) e extraído usando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A PCR ou qRT-PCR foi levada a cabo empregando 5 µl ou 2 µl respectivamente de cada mostra agás no caso do input que foi previamente diluído. Na **Táboa 10**, móstranse os oligonucleótidos empregados para a PCR ou qRT-PCR. Tras a realización da PCR os fragmentos de DNA sepáranse e identifícanse mediante electroforese en xel de agarosa ao 1.5%.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA 5'→3'	CASA COMERCIAL
mSox2 promotor	Forward:CCTAGGAAAAGGCTGGGAAC Reverse:GTGGTGTGCCATTGTTTCTG	Eurofins Genomics
mSox2-SRR1 enhancer	Forward:TCCCCCAATACTGGTGGTCGTCA Reverse:GAAGGCGAACGGCAGGGGAC	Eurofins Genomics
mSox2-SRR2 enhancer #1	Forward:ATTTATTCAGTTCCTCCAGTCCAAGC Reverse:CCCTCTCCCCCCCACGC	Eurofins Genomics
mSox2-SRR2 enhancer #2	Forward:CGTGGTAATGAGCACAGTCG Reverse:AGGCTGAGTCGGGTCAATTA	Eurofins Genomics
mp21 promotor	Forward:CCAGAGGATACCTTGCAAGGC Reverse:TCTCTGTCTCCATTCATGCTCCTCC	Eurofins Genomics
β-actina promotor	Forward:CAGTTCGCCATGGATGACGA-TATC Reverse:CCGCGAACCCGGCTTTGCACATG	Eurofins Genomics

Táboa 10. Oligonucleótidos empregados para a PCR ou qRT-PCR no ChIP.

Por outra banda, a análise das marcas de histonas realizouse esencialmente como se describe en Morey, L. et al., 2013. Brevemente, os MEFs wt, Rb -/- e p130 -/- foron cultivados en 5 placas de 150 mm até alcanzar o 90% de confluencia e fixados tras a adición de formaldehído ao 1% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A actividade da solución fixadora detívose mediante a adición de glicina (Fisher Scientific) a unha concentración final de 0.125 M durante 5 minutos en axitación a temperatura ambiente. Posteriormente as células foron lisadas en 1 mL de tampón de inmunoprecipitación e sonicadas durante 10 minutos nun sonicador Bioruptor (Diagenode). O material soluble foi cuantificado mediante un ensaio de Bradford e 100 µg de cromatina foron usados para inmunoprecipitar as modificacións de histonas. Os anticorpos que amosamos na **Táboa 11** foron incubados durante toda a noite coa cromatina.

ANTICORPO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL	HÓSPEDE	REACTIVIDADE
H3K27me3	07-499	Millipore	rabbit	human,mouse
H3K4me3	pAb003- 050	Diagenode	rabbit	human, mouse, zebrafish, Arabidopsis, rice, tomato, maize, poplar

Táboa 11. Anticorpos empregados no ChIP.

Os inmunocomplexos foron recuperados con 30 μ l de esferas de proteína agorosa A ou G. O material inmunoprecipitado foi lavado tres veces cun tampón baixo en sales e unha vez cun tampón alto en sales. Os complexos de DNA foron incubados durante 3 horas a 65°C e o DNA foi eluído en 200 μ l de auga usando o Kit PCR purification (QIAGEN). A qRT-PCR foi levada a cabo empregando 2 μ l de cada mostra. Na Táboa 12, móstranse os oligonucleótidos empregados para a PCR ou qRT-PCR.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA 5'→ 3'	CASA COMERCIAL
<i>mSox2-SRR2</i> enhancer #1	Forward:ATTTATTTCAGTTCCCAGTCCAAGC Reverse:CCCTCTCCCCCACGC	Eurofins Genomics
<i>mSox2-SRR2</i> enhancer #2	Forward:CGTGGTAATGAGCACAGTCG Reverse:AGGCTGAGTCGGGTCAATTA	Eurofins Genomics
<i>mNanog</i> promotor	Forward:CAACTTACTAAGGTAGCCCGA-GTCTTAA Reverse:CCTCCAAAAGTGCGGCTTT	Eurofins Genomics

Táboa 12. Oligonucleótidos empregados para a PCR ou qRT-PCR no ChIP.

10. ANÁLISE DA EXPRESIÓN DE GFP POR CITOMETRÍA DE FLUXO

A análise da expresión de GFP das células transfectadas co repoteiro PLSIN-EOS-C(3+)-EiP realizouse mediante citometría de fluxo seguindo o protocolo que se detalla a continuación:

- Retirar o medio de cultivo das células e realizar dous lavados con PBS 1X frío.
- Tripsinizar as células con tripsina 1X durante 5 minutos a 37°C no incubador.
- Engadir os mL de medio de cultivo necesarios para neutralizar a tripsinización.
- Contar e axustar o número de células a 1×10^6 .
- Posteriormente, pasar a suspensión celular a un tubo Falcon e centrifugar a 900 rpm durante 5 minutos a 37°C na centrífuga.
- Unha vez centrifugado, eliminar o sobrenadante e resuspender o pellet celular en 1 mL de PBS 1X/2%FBS nun tubo especial para citometría de fluxo (Falcon).

- Finalmente, medir a proporción de células positivas e a intensidade de expresión de GFP (fluorescencia) por citometría de fluxo no equipo FACScan (BD Biosciences)

11. ENSAIOS DE ACTIVIDADE LUCIFERASA E β -GALACTOSIDASA

11.1. Ensaio de actividade luciferasa

Os ensaios baseados na actividade luciferasa, utilizan o xene *luc* da luciferasa do vagalume (*firefly*) como xene repoteiro, permitindo o estudo dos mecanismos de expresión e regulación xénica a nivel transcricional. Neste tipo de ensaio a encima luciferasa cataliza a oxidación do substrato (D-Luciferina) en presenza dos cofactores ATP-Mg²⁺ dando lugar a unha emisión de luz (luminiscencia) que pode ser medida por un luminómetro.

Para a realización deste ensaio, as células correspondentes foron co-transfectadas cos plásmidos repoteiros luciferasa (pGL3-Basic, PG13-luc ou pGL3-Sox2 luc) e o plásmido pBP-lacZ, que permitirá posteriormente normalizar os valores da actividade luciferasa, mediante o método de transfección con PEI.

Ás 48 horas da co-transfección as células procésanse para obter os extractos celulares que se usarán no ensaio. Para iso, lávase 3 veces cada pozo con PBS 1X frío e a continuación incúbanse 30 minutos con 100 μ l de tampón de lise 5X (Roche) diluído en auga destilada a unha concentración 1X. Posteriormente recóllense os lisados celulares en xeo empregando un *scraper* (Falcon) e transfírense a un tubo *eppendorf* para centrifugarse a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Unha vez centrifugados, recóllese o sobrenadante que é onde se atopan os extractos celulares.

Unha vez obtidos os extractos celulares, para realizar o ensaio luciferasa empréganse 10 μ l de extracto celular ao que se lle engaden 50 μ l do tampón do ensaio luciferasa (25 mM Glicilglicina pH 7.8 (Alfa Aesar), 15 mM tampón fosfato pH 7.8 (KH₂PO₄ e K₂HPO₄, Fisher), 15 mM MgSO₄ (Acros Organics), 4 mM EGTA (Panreac AppliChem), 2 mM ATP (Panreac AppliChem), 1 mM DTT (Sigma-Aldrich) en auga destilada) e 50 μ l de D-Luciferina (Sigma-Aldrich) nunha placa de 96 pozos. A actividade luciferasa detéctase no luminómetro *Mithras LB 940* (Berthold Technologies) con inxector automático medíndose cada pozo durante 10 segundos.

11.2. Ensaio de actividade β -galactosidasa

A cantidade de actividade luciferasa medida polo luminómetro non depende unicamente da activación do xene repoteiro nas células. A diferenza no número de células transfectadas entre diferentes condicións de estudo pode dar orixe a erros na interpretación do resultado. Por iso precísase dunha medida que permita normalizar os valores da actividade luciferasa tendo en conta a eficiencia de transfección en cada caso. Isto lévase a cabo a través dun ensaio de actividade β -galactosidasa, que require da co-transfección cun plásmido normalizador, neste caso, o plásmido pBP-LacZ, que expresa o xene da β -galactosidasa.

Para realizar o ensaio β -galactosidasa empréganse 10 μ l de extracto celular ao que se lle engaden 70 μ l de tampón Z (40 mM NaH_2PO_4 (Fisher), 60 mM Na_2HPO_4 (Fisher), 10 mM KCl (Fisher), 1 mM MgSO_4 (Acros Organics), 350 μ l β -mercaptoetanol 98% (Sigma-Aldrich) en auga destilada) e 20 μ l de ONPG 3mg/mL (2-Nitro-phenyl β -D-galactopyranoside, Sigma-Aldrich) nunha placa de 96 pozos. Esta mestura incúbase a 37 °C unhas 7-8 horas e mídese a absorbancia a 450 nm no Mithras LB 940 (Berthold Technologies).

12. ENSAIO DE MIGRACIÓN CELULAR

Para analizar a capacidade de migración diferencial das células realizamos un ensaio de migración en *Transwell*. Para levar a cabo este ensaio empregáronse *Transwells* (Falcon) cunha membrana porosa que ten un tamaño do poro de 8.0 μ m, sobre os cales se depositan 2.5×10^4 ou 5.0×10^4 células segundo o tipo celular (2.5×10^4 células para A549 e 5.0×10^4 células para MCF7) suspendidas en DMEM suplementado pero sen FBS por triplicado. Ditos *Transwells* colócanse nunha placa de 24 pozos (Corning) sobre medio DMEM suplementado con 10% de FBS, xerándose así un gradiente que actúa como axente quimioatráente, estimulando a migración celular. No control negativo, os *Transwells* deposítanse sobre DMEM sen FBS, de tal maneira que non se xera o gradiente. Tras manterse durante 24 horas no incubador a 37°C e 5% de CO_2 realizouse unha tinguidura con Giemsa tal e como mencionamos no apartado 15. *Tinguidura con Giemsa*. A cuantificación da migración celular realizouse empregando o programa *ImageJ* tras a adquisición das imaxes no microscopio Axio Vert.A1 Microscope (Zeiss).

13. ENSAIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para avaliar a capacidade proliferativa das células realizamos un ensaio de proliferación celular, onde se sementaron 2.5×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos (Corning) por triplicado para cada tipo celular. Transcorridas 24, 48 e 72 horas levouse a cabo o recuento celular de forma manual mediante a utilización da cámara de Neubauer (Marienfeld).

14. ENSAIO DE FORMACIÓN DE COLONIAS

O ensaio de formación de colonias permitiu avaliar a capacidade que presentan as células en cultivo para crecer e dividirse en grupos. Para realizar este ensaio, as células sementáronse a baixa densidade (2000 ou 4000 células/pozo) en placas de 6 pozos (Corning) por triplicado para cada tipo celular. Despois de manterse en cultivo durante 14 días, as colonias tinguíronse con Cristal Violeta tal e como explicamos no apartado 16. *Tinguidura con Cristal Violeta*. As imaxes obtivéronse tras o seu escanado co escáner CanoScan LiDE 210 (Canon). A cuantificación do número total de colonias realizouse empregando o programa *ImageJ*.

15. TINGUIDURA CON GIEMSA

A continuación, detállase o protocolo para a tinguidura con Giemsa:

- Lavar as células 2 veces con PBS 1X.

MATERIAL E MÉTODOS

- Fixar as células con formaldehído ao 3.7% (EMS) en PBS 1X durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar as células 2 veces con PBS 1X.
- Permeabilizar as células con Metanol 100% (Millipore) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar as células 2 veces con PBS 1X.
- Tinguir con Giemsa (Sigma-Aldrich) ao 5% en auga destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente e en escuridade.
- Retirar a tinguadura con Giemsa e lavar 2 veces con PBS 1X.
- Por último deixar secar ben os *Transwells*.

16. TINGUIDURA CON CRISTAL VIOLETA

A continuación, detállase o protocolo para a tinguadura Cristal violeta:

- Lavar as células 2 veces con PBS 1X.
- Fixar as células con formaldehído ao 4% (EMS) en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar as células 2 veces con PBS 1X.
- Tinguir con Cristal violeta (Sigma-Aldrich) ao 0.5% en auga destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar a tinguadura cristal violeta e lavar 2 veces con PBS 1X.
- Por último, realizar sucesivos lavados con auga destilada e deixar secar ben a placa.

17. AVALIACIÓN DA MASA HIPOFISARIA

A masa hipofisaria (mg) dos ratos Rb-het/Sox2-TK tratados con HBSS ou GCV rexistrouse dixitalmente ás 42 semanas.

18. AVALIACIÓN DA MASA CORPORAL

A masa corporal (g) dos ratos Sox2^{TK} HBSS e Sox2^{TK} GCV rexistrouse dixitalmente ás 54 semanas. No caso dos machos e as femias Sox2^{TK} e Sox2^{WT} tratados con GCV a masa corporal (g) tamén se rexistrou de maneira dixital cada dúas semanas dende o inicio (8 semanas) até a finalización do tratamento (34 semanas), sendo finalmente representada como ganancia de masa corporal (g).

19. AVALIACIÓN DA CIFOSE

A cifose é a curvatura fisiolóxica da columna vertebral na rexión dorsal. O grao de cifose determinouse partir de fotografías dixitais mediante unha avaliación semicuantitativa usando o 0 como ausencia e o 1 como presenza. No caso dos ratos Sox2^{TK} HBSS e Sox2^{TK} GCV avalíouse ás 54 semanas e nos ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT} tratados con GCV ás 34 semanas.

20. AVALIACIÓN DA CANICIE

A canicie é a perda de pigmentación do pelo, que se volta gris ou branco. A canicie determinouse partir de fotografías dixitais mediante unha avaliación semicuantitativa usando o 0 como ausencia e o 1 como presenza. No caso dos ratos Sox2^{TK} HBSS e Sox2^{TK} GCV avalíase ás 54 semanas e nos ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT} tratados con GCV ás 34 semanas.

21. AVALIACIÓN DA COMPOSICIÓN CORPORAL

Os ratos Sox2^{TK} HBSS e Sox2^{TK} GCV de 54 semanas e os ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT} tratados con GCV de 34 semanas escanábanse individualmente nun sistema baseado en imaxes por resonancia magnética (MRI) denominado EchoMRITM-100H (Whole Body Composition Analyser, Echo Medical System) que analizou a composición corporal de masa magra ou graxa de cada rato. A porcentaxe de masa magra ou graxa corporal calculouse ca seguinte fórmula: masa magra ou graxa corporal (g)/ peso corporal (g) x 100.

22. ENSAIO DE COORDINACIÓN NEUROMUSCULAR

Para realizar o ensaio de coordinación neuromuscular, denominado *tightrope test*, os ratos Sox2^{TK} HBSS e Sox2^{TK} GCV de 54 semanas e os ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT} tratados con GCV de 34 semanas colocáronse nunha barra de sección circular (60 cm de longo e 1.5 cm de diámetro) e considerouse a proba como un éxito cando un rato non cae durante un período de 60 segundos en polo menos un dos ensaios dos cinco ensaios consecutivos realizados.

23. ENSAIO DE RECRECIMENTO DE PELO

No ensaio de recrecemento de pelo, un cadrado de aproximadamente 1.5 cm x 1.5 cm é eliminado mediante depilación da parte dorsal dos ratos Sox2^{TK} HBSS e Sox2^{TK} GCV de 54 semanas e os ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT} tratados con GCV de 34 semanas. O crecemento do pelo determinase aos 15 días a partir de fotografías dixitais e unha avaliación semicuantitativa usando unha escala arbitraria do 1 ao 3 (sendo o 3 a rexeneración completa do pelo).

24. ENSAIOS DE ACTIVIDADE β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA

A actividade β -galactosidasa asociada a senescencia deriva dun incremento no contido lisosomal que presentan as células senescentes. Neste traballo realizáronse dous tipos de ensaio para avaliar esta actividade.

24.1. Ensaio con substrato cromoxénico (X-Gal): Tinguidura β -galactosidasa

A actividade β -galactosidasa asociada a senescencia foi detectada co substrato cromoxénico X-Gal segundo o protocolo previamente descrito (Dimri, G.P. et al., 1995). As seccións de tecido (neste caso, seccións de ril incluídas en OCT (Optimal Cutting Temperature, Sakura) lávanse con PBS 1X e fíxanse con 2% formaldehído (EMS)/0.2% glutaraldehído (Fisher Scientific) en PBS 1X durante 25 mi-

nutos en axitación. Posteriormente, lávanse 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos en axitación e tinguense coa solución de tinguidura β -galactosidasa (1mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-galactoside, Fisher Scientific), 40 mM ácido cítrico/fosfato sódico pH 5.5, 5 mM $K_3Fe[CN]_6$, 5 mM $K_4Fe[CN]_6$, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ en auga destilada) toda a noite en escuridade nunha estufa a 37°C en axitación. Ao día seguinte realízanse 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos en axitación e tinguense as mostras con Nuclear Fast Red (NFR) tal e como mostramos no apartado 25.2. *Tinguidura Nuclear Fast Red (NFR) de seccións de tecido incluídas en OCT*. A cuantificación do número de células positivas para a tinguidura β -galactosidasa realizouse empregando o programa ImageJ.

24.2. Ensaio con substrato quimioluminiscente (Galactón)

Este tipo de ensaio permite detectar a actividade β -galactosidasa asociada a senescencia mediante un método quimioluminiscente que utiliza o galactón como substrato da β -galactosidasa. Este método permite cuantificar esta actividade e mellora a sensibilidade con respecto ao método colorimétrico anteriormente citado (Bassaneze, V. et al., 2008).

Para realizar este ensaio, utilízase o Kit *Galacto-Light Plus™ β -Galactosidase Reporter Gene Assay System* (Applied Biosystems) con algunhas modificacións con respecto ás indicacións proporcionadas polo fabricante co fin de detectar a actividade β -galactosidasa asociada a senescencia.

Primeiro obtivéronse os extractos proteicos de 20-30 mg de tecido (neste caso, ril) en tampón de lise (*Tropix Lysis Solution*, Applied Biosystems) tras a súa disgregación no *TissueLyser II* (Qiagen) durante 3 minutos a 30 Hz en tubos de plástico *Eppendorf* con feche de seguridade (*Safe-Lock Tubes 2.0 mL*, *Eppendorf Quality*) cunha bola de aceiro inoxidable. Posteriormente, transfírense 5 μ L de cada extracto proteico por triplicado a un pozo dunha placa p96 (*Corning*) á que se lle engade 70 μ L do tampón de reacción con galactón (dilución 1:100 de *Tropix GALACTON-Plus* (Applied Biosystems) en tampón de ácido cítrico/fosfato sódico pH 5.5, 200 mM). Tras unha incubación de 2 horas en escuridade a temperatura ambiente desta mestura, engádese 100 μ L de acelerador (*Tropix Accelerator II*, Applied Biosystems) a cada pozo e mídese a luminiscencia no luminómetro *Mithras LB 940* (Berthold Technologies) durante 1 segundo/pozo. Os resultados foron normalizados con respecto aos mg de tecido a partir dos cales se prepararon os extractos proteicos.

25. ANÁLISE HISTOLÓXICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Denominamos análise histolóxica a unha serie de métodos e técnicas empregados para poder estudar as características morfolóxicas e moleculares dos tecidos. Para realizar unha análise histolóxica dos tecidos, neste traballo algúns tecidos foron fixados por inmersión nunha solución fixadora denominada formalina (Panreac AppliChem) a 4°C e outros mediante conxelación rápida en xeo seco tras depositar a mostra nun criomolde (Sakura) e estar embebida nun crioprotector denominado OCT. No caso dos tecidos fixados en formalina, estes foron poste-

riormente incluídos en parafina (Millipore). Dado que a parafina non é miscible coa auga e que todos os tecidos están formados principalmente por auga, para que a parafina líquida poida penetrar completamente no tecido ten que substituírse a auga por un solvente orgánico. Isto conseguiuase mediante a deshidratación do tecido en alcohol, de gradación crecente até alcohol de 100°C de forma automatizada no procesador de tecidos Leica ASP6025. Tras transferir o tecido a xilol (Sigma-Aldrich), unha substancia intermediaria que é miscible tanto co alcohol de 100°C como coa parafina, a mostra é embebida por completo en parafina líquida nun molde e deixase solidificar a temperatura ambiente. Os tecidos incluídos en parafina foron cortados no microtomo de rotación Leica RM2255 en seccións de 5 µm mentres os tecidos conxelados en OCT foron cortados no criostato Leica CM1850 UV en seccións finas de 4 µm.

A continuación mostramos en detalle os protocolos a seguir para a realización da tinguidura Hematoxilina-Eosina (H&E), Nuclear Fast Red (NFR) e a técnica de Inmunohistoquímica encimática en diferentes seccións de tecido.

25.1. Tinguidura hematoxilina-eosina (H&E) de seccións de tecido incluídas en parafina

A tinguidura H&E é unha das tinguiduras máis empregadas en histoloxía. Nesta tinguidura, a hematoxilina que é catiónica ou básica tingue as estruturas ácidas de azul e púrpura como os núcleos celulares e a eosina que é aniónica ou ácida tingue os compoñentes básicos de cor rosa, como o citoplasma. Neste traballo a tinguidura H&E realizouse seguindo o protocolo que se detalla a continuación:

- Eliminar os restos de parafina dos cortes de tecido incluídos en parafina durante 30 minutos a 65 °C na estufa.
- Posteriormente, desparafinar e hidratar as mostras mergullándoas nas seguintes solucións: xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos) e auga destilada (5 minutos).
- Tinguir as mostras con Hematoxilina (Panreac AppliChem) durante 2 minutos.
- Realizar dous lavados con auga corrente quente .
- Tinguir con Eosina (Millipore) durante 1 minuto.
- Realizar dous lavados con auga corrente quente .
- Unha vez tinguidas, deshidratar as mostras mergullándoas nas seguintes solucións: alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 96°(5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos).
- Por último, realizar un lavado con auga destilada para aclarar a mostra e montar os cubreobxectos de 24 x 50 mm (Deltalab) sobre os portaobxectos de 26 x 76 mm (Deltalab). O medio de montaxe empregado foi Entellan (Millipore).

25.2. Tinguadura Nuclear Fast Red (NFR) de seccións de tecido incluídas en OCT

A tinguadura NFR permítenos tinguir os núcleos celulares dunha maneira moi rápida. O protocolo da tinguadura NFR detállase a continuación:

- Tinguir as mostras con NFR (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos.
- Realizar varios lavados con auga Braun.
- Unha vez tinguidas, deshidratar as mostras mergullándoas nas seguintes solucións: alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos).
- Por último, realizar un lavado con auga destilada para aclarar a mostra e montar os cubreobxectos de 24 x 50 mm (Deltalab) sobre os portaobxectos de 26 x 76 mm (Deltalab). O medio de montaxe empregado foi Entellan (Millipore).

25.3. Inmunohistoquímica encimática

A inmunohistoquímica encimática é unha técnica que permite a localización de moléculas nos tecidos mediante a utilización de anticorpos conxugados a encimas, o que permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes no tecido. As inmunohistoquímicas de Sox2 e Ki67 realizáronse seguindo o protocolo que detallamos a continuación:

- As inmunohistoquímicas que se realizan neste traballo son en seccións de tecido incluídas en parafina, polo tanto, primeiro hai que eliminar os restos de parafina dos cortes durante 30 minutos a 65°C na estufa.
- Posteriormente, desparafinar e hidratar as mostras mergullándoas nas seguintes solucións: xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 70° (5 minutos), auga destilada (5 minutos).
- A continuación, realízase a recuperación dos antíxenos mediante calor. Para isto, hai que somerxer as mostras nunha solución de desenmascaramento que consiste en citrato pH 6 10X (*Target Retrieval Solution Citrate pH 6*, Dako) diluído en auga destilada a unha concentración 1X e quecer 3 veces durante 5 minutos nunha fonte de calor, neste caso, un microondas a potencia media (650 W) e deixar arrefriar durante 3 minutos entre cada quecemento. Logo do último quecemento, deixar arrefriar durante 40 minutos.
- Lavar durante 5 minutos en auga destilada.
- Dado que esta inmunohistoquímica é de tipo encimático (anticorpos secundarios conxugados á encima HRP, hai que realizar o paso de inhibición da peroxidasa endóxena con H₂O₂ (Peroxido de Hidroxeno 30% p/v Auga Oxixenada 110 vols, Foret) ao 3% en auga destilada durante 10 minutos.

- Lavar durante 5 minutos en auga destilada.
- Permeabilizar con TBS 1X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100) tres veces durante 5 minutos.
- Bloquear coa solución de bloqueo (TBS 1X 5% FBS (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Incubación co anticorpo primario diluído na dilución correspondente (**Táboa 13**) en TBS 1X 0.1% Triton X-100 3% FBS durante toda a noite a 4°C. Neste caso, os controis (sen anticorpo primario) fican en solución de bloqueo (TBS 1X 5% FBS).

ANTICORPO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL	HÓSPEDE	REACTIVIDADE	DILUCIÓN
Sox2 (C70B1)	#3728	Cell Signaling	<i>rabbit</i>	<i>mouse</i>	1:200
Ki67 (Clon SP6)	MAD 000310QD	Master Diagnostica	<i>rabbit</i>	<i>Human,mouse rat,dog, swine</i>	prediluído

Táboa 13. Anticorpos primarios empregados en Inmunohistoquímica encimática.

- Lavar 3 veces durante 5 minutos con TBS 1X 0.1% Triton X-100.
- Incubación co anticorpo secundario diluído na dilución correspondente (**Táboa 14**) en TBS 1X 0.1% Triton X-100 3% FBS durante 45 minutos a temperatura ambiente.

INMUNOESPECIFICIDADE	REFERENCIA	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
<i>Rabbit IgG -HRP</i>	7074	Cell Signaling	1:100

Táboa 14. Anticorpo secundario empregado en Inmunohistoquímica encimática.

- Lavar 3 veces durante 5 minutos con TBS 1X 0.1% Triton X-100.
- Revelado con DAB (Diamino-bencidina) utilizando o EnVision DuoFLEX System (Dako, SK110) durante 15 minutos. A reacción párase con auga.
- Contratinguidura con Hematoxilina diluída 1:10 en auga destilada durante 1 minuto.
- Lavar durante 5 minutos en auga destilada.
- Unha vez tinguidas, deshidratar as mostras mergullándoas nas seguintes solucións: alcohol de 70° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), alcohol de 100° (5 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), xilol (10 minutos).

MATERIAL E MÉTODOS

- Por último, montar os cubreobxectos de 24 x 50 mm (Deltalab) sobre os portaobxectos de 26 x 76 mm (Deltalab). O medio de montaxe empregado foi Entellan (Millipore).
- A cuantificación do número de células positivas para Sox2 e Ki67 realizouse empregando o programa *ImageJ*.

26. MICROSCOPIA

O microscopio óptico *Primo Vert Microscope* (Zeiss) empregouse para a visualización rutineira dos cultivos celulares, mentres a adquisición das fotografías de campo claro e fluorescencia a distintos aumentos realizouse no microscopio *Axiio Vert.A1 Microscope* (Zeiss).

27. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significación estatística dos datos obtidos analizouse mediante o test *t* de *Student* de dúas colas ou o test exacto de Fisher: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.



RESULTADOS



1. REGULACIÓN DE SOX2 POR PROTEÍNAS POCKET EN CANCRO

Tendo en conta os resultados previos con respecto á represión transcricional de Sox2 por un complexo represivo formado a parte de polo inhibidor do ciclo celular p27, SIN3A e E2F4, o membro da familia das proteínas pocket p130 (Li, H. et al., 2012), xunto coas similitudes entre o proceso de reprogramación celular e transformación oncoxénica (Daley, G.Q., 2008), quixemos investigar o papel dos membros da familia das proteínas pocket na represión transcricional de Sox2.

1.1. As células carentes de Rb ou p130 expresan niveis máis altos de Sox2

Estudos previos mostraron que o regulador do ciclo celular p27 contribúe á represión transcricional de Sox2 xunto coa proteína pocket p130 e por conseguinte, as células deficientes en p27 ou KD para p130 mediante un shRNA teñen un incremento da expresión de Sox2 que ten consecuencias fenotípicas (Li, H. et al., 2012). Para estudar en máis detalle a posible contribución dos membros da familia das proteínas pocket na represión de xenes de pluripotencia, e especificamente na regulación de Sox2, medimos os niveis de mRNA de Sox2 e Nanog mediante qRT-PCR en MEFs de pase temperá que proceden de ratos deficientes para Rb, p107 e p130. Neste caso empregamos o xene de pluripotencia Nanog como control. Como era de esperar os MEFs wt non expresan niveis detectables destes xenes de pluripotencia, pero en cambio a ausencia de Rb ou p130 provoca un incremento dos niveis de mRNA de Sox2. Non obstante, a ausencia da proteína pocket p107 non provoca ningún cambio nos niveis de expresión de Sox2. Sorprendentemente, as células carentes de Rb tamén mostran niveis incrementados de Nanog, un xene de pluripotencia que normalmente non se expresa en células diferenciadas (**Figura 25**).

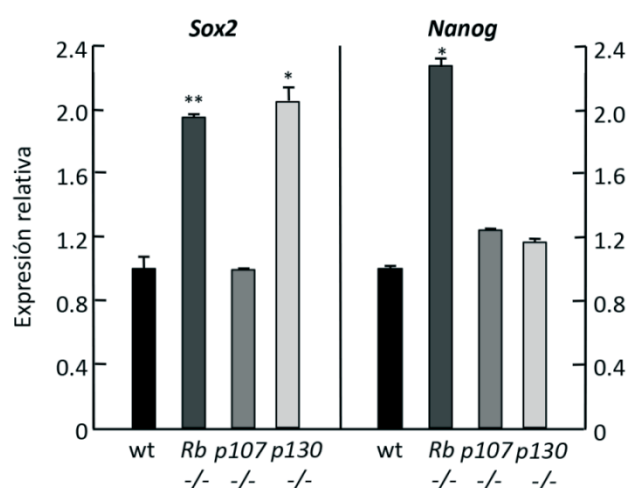


Figura 25. As células carentes de Rb ou p130 expresan niveis máis altos de Sox2. Os niveis de mRNA de Sox2 (esquerda) e Nanog (dereita) en MEFs primarios wt, Rb^{-/-}, p107^{-/-} e p130^{-/-} medíronse mediante unha análise de expresión Taqman. Os valores absolutos están referenciados con respecto aos niveis obtidos nos MEFs wt. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

RESULTADOS

Curiosamente, cando analizamos a expresión de Sox2 en MEFs deficientes para Rb, p107 e p130 inmortalizados mediante un shRNA contra p53 (shp53), observamos un maior incremento na expresión de Sox2 especificamente en MEFs carentes de Rb ou p130, pero non en células wt ou p107 -/- (**Figura 26**). Polo contrario, a expresión incrementada de Nanog mantense constante en MEFs deficientes para Rb incluso despois da inmortalización co shp53 (dato non mostrado).

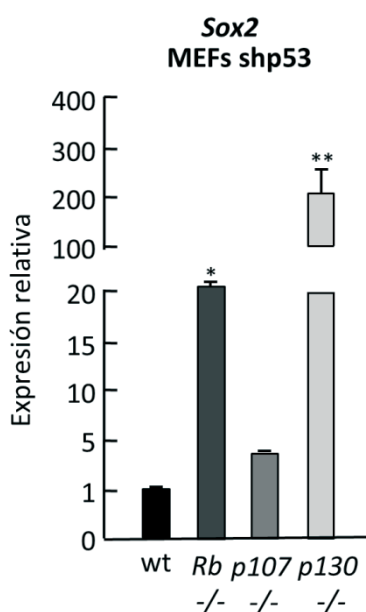


Figura 26. As células deficientes para Rb, p107 e p130 inmortalizadas mediante un shRNA contra p53 (shp53) incrementan a expresión de Sox2 en MEFs carentes de Rb ou p130, pero non en células wt ou p107 -/-. Os niveis de mRNA de Sox2 en MEFs wt, Rb -/-, p107 -/- e p130 -/- inmortalizados co pRetroSuper-puro-shp53 medíronse mediante unha análise de expresión Taqman. Os valores absolutos son relativos con respecto aos niveis obtidos nos MEFs wt. A significación estatística analizouse mediante o test t de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

Para confirmar estes resultados, posteriormente analizamos os niveis de Sox2 en MEFs inmortalizados pola expresión da oncoproteína viral antixeno LT do SV40. O antixeno LT coñécese pola súa capacidade para bloquear varias funcións celulares, entre elas as vías supresoras de tumores controladas por p53 e as tres proteínas pocket (Levine, A.J., 2009).

En relación cos resultados anteriores, os MEFs inmortalizados polo antixeno LT mostraron un incremento na expresión do mRNA de Sox2 por qRT-PCR (**Figura 27A**), con niveis o suficientemente altos para permitir a detección de Sox2 por Western blot (**Figura 27B**).

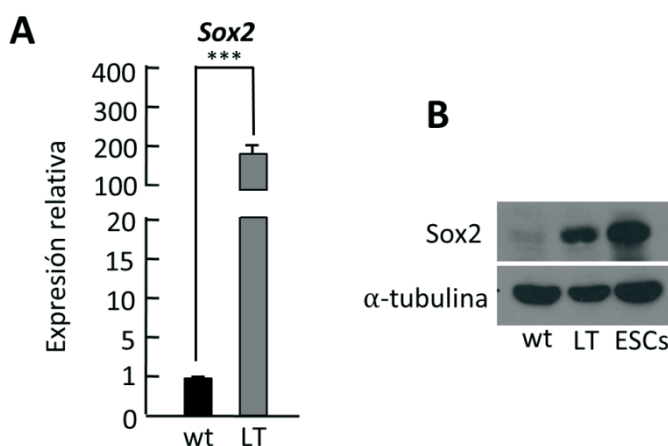


Figura 27. Os MEFs inmortalizados pola expresión da oncoproteína viral antíxe-no LT do SV40 mostran un incremento na expresión de Sox2. Expresión do mRNA de Sox2 (A) e proteína (B) por Western blot en extractos celulares de MEFs wt e MEFs inmortalizados co antíxe-no LT do SV40. Os valores absolutos están referenciados con respecto aos niveis obtidos nos MEFs wt. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

Como comentamos anteriormente, o KD de p53 despois da expresión do shp53 non causa un incremento de Sox2 en MEFs wt. Parece que isto só acontece en células deficientes en Rb ou p130, que xa están sometidas a algún tipo de desregulación con respecto á expresión de Sox2. Para seguir estudando isto, empregamos MEFs reprogramables que proceden dun rato transxénico que porta un casete inducible para a expresión dos catro factores de reprogramación, Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc (i4F-MEFs) (Abad, M. et al., 2013). Primeiro introducimos o plásmido repoteiro de pluripotencia EOS-GFP que contén un promotor activo derivado dun transposon temperá de rato (ETn) que é específico para células nai pluripotentes indiferenciadas, en combinación con motivos de unión para Oct4 e Sox2 (EOS) (Hotta, A. et al., 2009). Os MEFs reprogramables que conteñen este plásmido EOS-GFP mostraron un nivel de expresión de GFP baixo, indicativo dunhas pequenas fugas de expresión de menor importancia do casete transxénico. Cando se expresa o shRNA contra p53 (shp53) nestes i4F-MEFs que conteñen o repoteiro EOS-GFP, a expresión de GFP incrementa claramente cando os observamos no microscopio de fluorescencia. Para verificar e cuantificar esta observación, analizamos a expresión de GFP nestas células por citometría de fluxo (**Figura 28A**). Desta maneira, confirmamos a observación visual con respecto á proporción de células positivas para GFP (51.7% en i4F-MEFs fronte a 71.1% en i4F-MEFs-shp53) e a intensidade da expresión de GFP (fluorescencia media de 116.38 en i4F-MEFs fronte a 265.09 en i4F-MEFs-shp53). En concordancia cos datos de fluorescencia, estas células

RESULTADOS

mostraron por qRT-PCR un nivel de expresión de Sox2 baixo que estaba por riba dos niveis observados en células wt. Estes niveis de expresión de Sox2 baixos incrementaron notablemente cando se introduciu o shp53 en i4F-MEFs pero non en células wt, suxerindo de novo que a diminución dos niveis de p53 amplifica a expresión de Sox2 desregulada previamente (**Figura 28B**), aínda cando esta desregulación inicial provén da expresión do casete transxénico. O aumento dos niveis observados despois do KD de p53 non foron producidos polo transxene senón por Sox2 endóxeno, xa que se detectaron empregando un par de oligonucleótidos específicos para o Sox2 endóxeno. Estes resultados implican que un nivel de expresión baixo de Sox2 sería suficiente para activar a súa propia transcrición endóxena sempre que p53 estea regulado negativamente, o que apunta a unha nova función de p53 bloqueando a expresión de Sox2 en células diferenciadas.

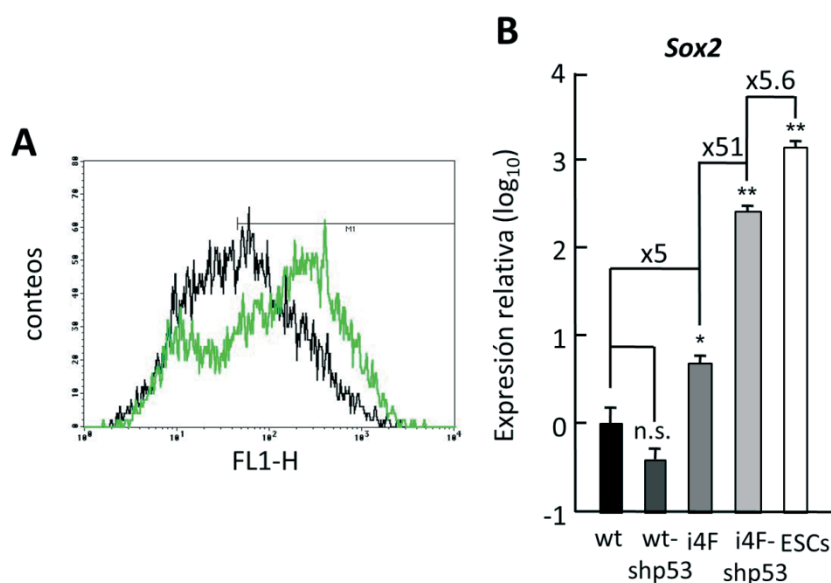


Figura 28. Os MEFs reprogramables inmortalizados por un shRNA contra *p53* mostran un incremento na expresión de Sox2 con respecto a MEFs reprogramables sen inmortalizar. A, gráfica que mostra a análise dos niveis de expresión de GFP mediante citometría de fluxo do plásmido reporteiro de pluripotencia EOS-GFP introducido en MEFs reprogramables primarios (i4F-MEFs, liña negra) ou inmortalizados co pRetroSuper-puro-shp53 (i4F-MEFs-shp53, liña verde). A configuración axustouse previamente considerando os i4F-MEFs sen o plásmido EOS-GFP como GFP negativo. B, qRT-PCR dos niveis de mRNA de *Sox2* expresados en MEFs wt ou inmortalizados wt-shp53 MEFs, en i4F ou i4F-shp53 MEFs e ESCs. Os valores están referenciados con respecto aos niveis obtidos nos MEFs wt e en escala \log_{10} . A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

En conxunto, estes resultados mostran que unha represión defectuosa da transcripción de Sox2 en ausencia de Rb ou p130 resulta en niveis baixos pero reproducibles deste xene implicado en pluripotencia en células primarias. A perda de p53 conduce a maiores niveis de expresión de Sox2 só cando están previamente desregulados pola deficiencia de Rb ou p130.

1.2. As proteínas *pocket* pRb e p130 únense ao *enhancer* Sox2-SRR2 e a súa ausencia altera as marcas epixenéticas no *enhancer*

O principal elemento regulador de Sox2 en células nai pluripotentes é un *enhancer* localizado *downstream* do único exón codificante do xene Sox2, denominado SRR2, ao que se une o propio Sox2 e Oct4 para conducir positivamente a súa expresión durante o estado de pluripotencia (Tomioaka, M. et al., 2002). Tras a diferenciación, Sox2-Oct4 son desprazados do *enhancer* SRR2 por un complexo represivo formado por p27, SIN3A, E2F4 e o membro da familia das proteínas *pocket*, p130, que ocupa permanentemente este elemento regulador en células somáticas (Li, H. et al., 2012). En base a isto, decidimos buscar onde se une pRb, p107 e p130 en células diferenciadas realizando un ChIP empregando extractos procedentes de MEFs. A cromatina precipitada empregando anticorpos contra pRb, p107 e p130 produciu unha banda que detectamos mediante PCR usando oligonucleótidos que nos permiten amplificar o *enhancer* Sox2-SRR2 (**Figura 29**). Pola contra, o control IgG non produciu amplificación da banda.

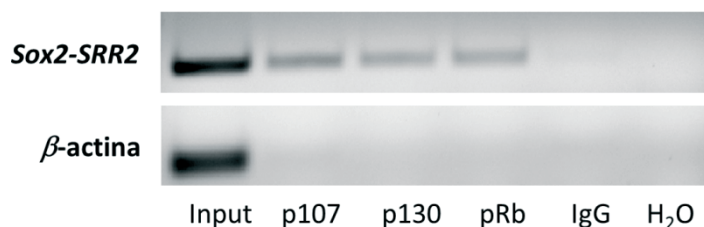


Figura 29. Unión da familia das proteínas *pocket* ao *enhancer* Sox2-SRR2. ChIP empregando anticorpos contra p107, p130 e pRb seguido da realización dunha PCR semicuantitativa usando oligonucleótidos que amplifican o *enhancer* Sox2-SRR2. Os oligonucleótidos que amplifican o promotor de β -actina e IgG usáronse como controis negativos.

Estes resultados implican que as tres proteínas da familia das proteínas *pocket* teñen o potencial de unirse ao *enhancer* Sox2-SRR2.

A ausencia de p27 no complexo represivo que se une ao *enhancer* Sox2-SRR2 conduce a unha alteración das marcas de histonas activas e represivas presentes no *enhancer* (Li, H. et al., 2012). Tendo en conta que pRb e p130 se unen ao *enhancer* Sox2-SRR2 e a desrepresión de Sox2 observada nestas células, preguntámonos se a ausencia das proteínas *pocket* provocaría unha situación similar. Para investigar este punto, realizamos ChIP con anticorpos contra a marca represiva H3K27me3

RESULTADOS

e a marca activadora H3K4me3 en extractos celulares de MEFs deficientes para pRb ou p130, seguido de qRT-PCR para cuantificar a presenza de Sox2-SRR2 nos inmunoprecipitados. Obtivemos resultados similares empregando dous pares diferentes de oligonucleótidos que nos permitiron amplificar o *enhancer* Sox2-SRR2 (**Figura 30**). A marca de histona represiva H3K27me3 parece estar reducida en células deficientes para os membros da familia das proteínas *pocket* Rb e p130, mentres que a marca activadora H3K4me3 parece aumentar na ausencia de p130 cos dous pares de oligonucleótidos, e na ausencia de Rb polo menos cando se emprega un dos dous pares de oligonucleótidos (**Figura 30**). Pola contra, o ChIP para estas mesmas marcas de histonas no promotor de *Nanog* non mostrou ningunha alteración (**Figura 30**). Estes cambios apoian a noción de que a falta de Rb ou p130 ten un impacto específico nas marcas epixenéticas arredor do *enhancer* Sox2-SRR2.

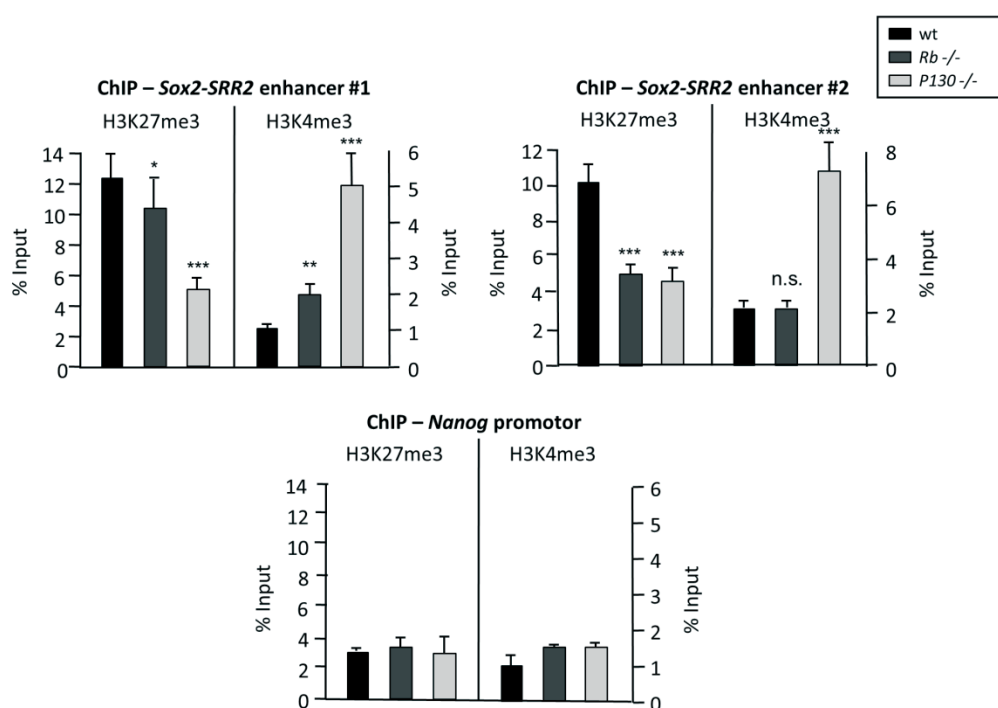


Figura 30. A ausencia das proteínas *pocket* pRb e p130 altera as marcas epixenéticas no *enhancer* Sox2-SRR2. ChIP das marcas de histonas represiva (H3K27me3) e activa (H3K4me3) no *enhancer* Sox2-SRR2 de MEFs wt, Rb -/- e p130 -/-, empregando dous pares de oligonucleótidos diferentes que amplifícan o *enhancer* Sox2-SRR2. O ChIP control emprega oligonucleótidos que amplifícan o promotor de *Nanog*. Os valores están normalizados con respecto ao input. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

1.3. As células que perden *Rb* poden reprogramarse sen *Sox2* ectópico

Dado que os MEFs primarios deficientes para *Rb* expresan niveis baixos de *Sox2*, preguntámonos se esta expresión desregulada podería ter consecuencias fenotípicas. Para isto, realizamos un experimento de reprogramación celular en MEFs wt e deficientes para as tres proteínas *pocket* coa expresión ectópica de *Oct4*, *Klf4* e *Sox2* (3F-OKS), ou omitindo *Sox2* (2F-OK). O experimento de reprogramación control de MEFs wt con 3F-OKS funcionou perfectamente dando lugar a colonias de iPSCs positivas para a tinguidura AP, despois de 14 días coa morfoloxía típica e a relación esperada. Como xa era de esperar, os MEFs wt con 2F-OK non produciron ningunha colonia. Pola contra, cando usamos MEFs deficientes para *p130* obtivemos colonias iPSCs tanto con 3F-OKS como con 2F-OK, aínda que as colonias obtidas con 2F-OK son menos frecuentes como xa se describiu (Li, H. et al., 2012). Os MEFs deficientes para *p107* reprogramáanse aproximadamente na mesma relación que as células wt con 3F-OKS, en cambio con 2F-OK non se conseguiu obter ningunha colonia. Cando empregamos MEFs carentes de *Rb* obtemos colonias iPSCs positivas para a tinguidura AP non só con 3F-OKS senón tamén con 2F-OK, é dicir, sen *Sox2* ectópico (**Figura 31**). Como xa nos esperábase a eficiencia e a cinética do proceso de reprogramación con 2F-OK foi moi baixa. Para demostrar a pluripotencia das colonias de iPSCs obtidas, introducimos o plásmido repoteiro de pluripotencia EOS-GFP que xa mencionamos anteriormente. A transdución lentiviral do plásmido EOS-GFP en MEFs antes da expresión dos factores de reprogramación permitiunos observar a aparición de colonias iPSCs GFP positivas procedentes de MEFs carentes de *Rb* reprogramados só con 2F-OK (**Figura 31**).

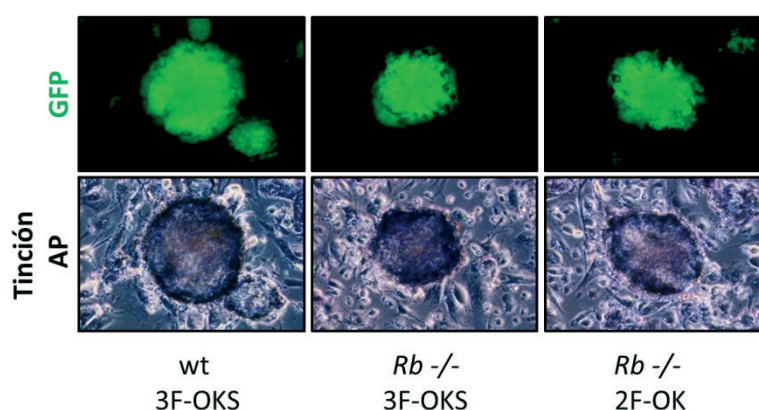


Figura 31. Os MEFs carentes de *Rb* son capaces de reprogramarse só con dous factores (*Oct4* e *Klf4*). Imaxes representativas a 20X das colonias iPSCs expresando GFP do plásmido repoteiro de pluripotencia EOS-GFP (paneis superiores) e tinguidas con AP (paneis inferiores). Nestas figuras móstranse as colonias iPSCs obtidas de MEFs wt despois da expresión dos tres factores de reprogramación (*Oct4*, *Klf4* e *Sox2*; 3F-OKS; panel da esquerda), e MEFs carentes de *Rb* despois da expresión de tres factores (3F-OKS; panel do medio) ou dous factores (*Oct4*, *Klf4*; 2F-OK; panel da dereita).

RESULTADOS

Todas estas colonias foron picadas e expandidas en condicións de cultivo de células nai. Posteriormente, analizamos os niveis de mRNA de Oct4, Sox2, Klf4 e Nanog endóxenos mediante qRT-PCR, o que confirmou a expresión dos factores de pluripotencia en todas as colonias obtidas (**Figura 32A**). De maneira similar, a análise dos extractos proteicos das colonias iPSCs mediante Western blot mostrou a presenza das proteínas Oct4, Sox2 e Nanog en todas as colonias (**Figura 32B**). As colonias iPSCs que derivan de MEFs *Rb* ^{-/-} con 2F-OK expresan niveis de mRNA ou proteína de todos os marcadores de pluripotencia similares aos obtidos en MEFs wt ou MEFs carentes de *Rb* empregando 3F-OKS, ou que o noso control positivo, as ESCs.

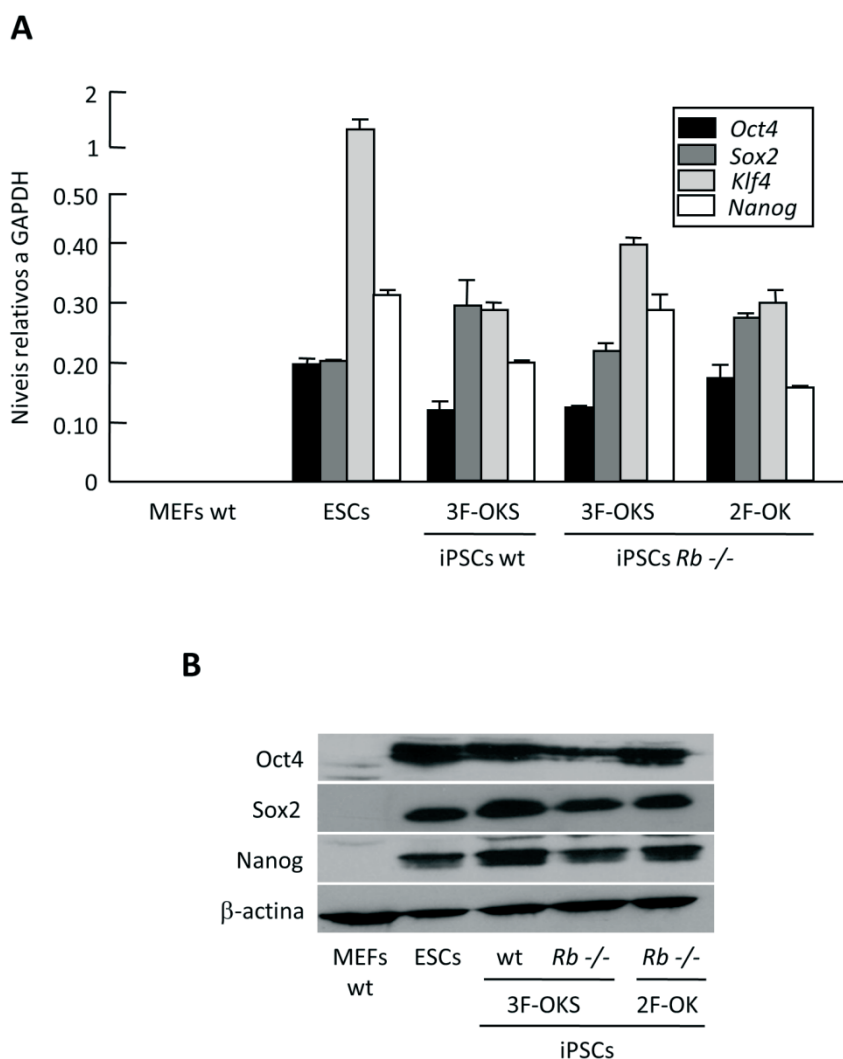


Figura 32. As colonias iPSCs que derivan de MEFs *Rb* ^{-/-} con 2F-OK expresan niveis de mRNA e proteína de varios marcadores de pluripotencia. **A**, análise da expresión de mRNA dos factores de pluripotencia (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* e *Nanog*) mediante qRT-PCR en colonias iPSCs obtidas a partir de MEFs wt reprogramados por 3F-OKS ou MEFs *Rb* ^{-/-} reprogramados con 3F-OKS ou 2F-OK. Empregamos os MEFs e as ESCs como control negativo e positivo, respectivamente. **B**, aná-

lise da expresión dos factores de pluripotencia (Oct4, Sox2 e Nanog) mediante Western blot en colonias iPSCs obtidas a partir de MEFs wt reprogramados por 3F-OKS ou MEFs *Rb*^{-/-} reprogramados con 3F-OKS ou 2F-OK.

De seguido testamos a capacidade das iPSCs derivadas de MEFs deficientes en *Rb* reprogramadas con 2F-OK de formar EBs en cultivo. Para formar EBs empregamos o método da gota colgante ou “*hanging drop*” que consiste na formación de agregados celulares cultivados en condicións non adherentes até que espontaneamente mostran actividade contráctil, que é indicativo de diferenciación cardiomiocítica. O número e tamaño dos EBs obtidos a partir de células wt e deficientes para *Rb* con 3F-OKS, ou con 2F-OK para MEFs deficientes en *Rb*, foi similar (**Figura 33**).

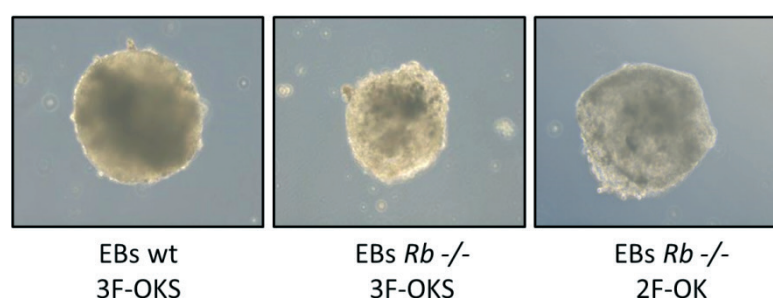


Figura 33. As iPSCs procedentes de MEFs *Rb*^{-/-} con 2F-OK son capaces de formar EBs. Imaxes representativas a 20X dos EBs obtidos despois da diferenciación espontánea *in vitro* de iPSCs xeradas a partir de MEFs wt reprogramados con 3F-OKS e MEFs *Rb*^{-/-} reprogramados con 3F-OKS ou 2F-OK.

Posteriormente, extraeuse RNA dos diferentes EBs e analizamos mediante qRT-PCR marcadores de diferenciación das tres capas xerminais, endodermo (*Gata4*), mesodermo (*Nkx2.5*) e ectodermo (*Dlx3*), de maneira que confirmamos así a capacidade pluripotente que presentan as iPSCs obtidas a partir de MEFs *Rb*^{-/-} 2F-OK (**Figura 34**).

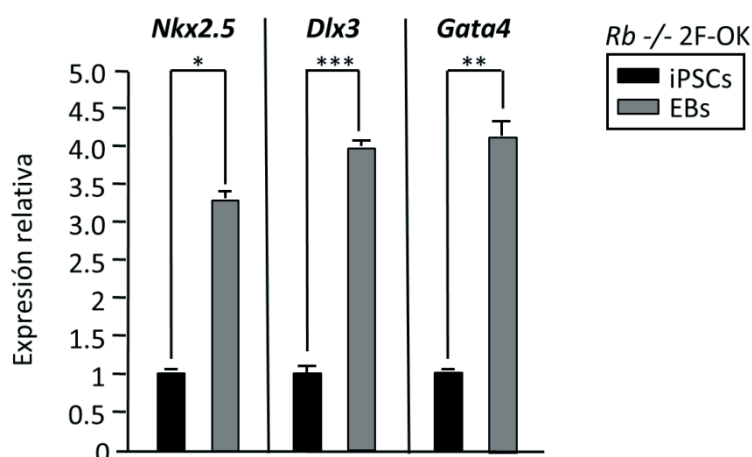


Figura 34. Os EBs de iPSCs procedentes de MEFs *Rb* ^{-/-} con 2F-OK expresan marcadores de diferenciación das tres capas xerminais. Na figura observamos os niveis de mRNA de diferentes marcadores de diferenciación (*Nkx2.5*, *Dlx3* e *Gata4*) analizados por qRT-PCR en EBs obtidos a partir de iPSCs xeradas de MEFs *Rb* ^{-/-} reprogramados con 2F-OK. Os valores están referenciados con respecto á expresión obtida nas iPSCs correspondentes. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

Ademais, tamén analizamos histoloxicamente cada unha das estruturas xeradas dentro dos EBs de iPSCs procedentes de MEFs *Rb* ^{-/-} con 2F-OK e observamos características de diferenciación das tres capas xerminais (**Figura 35**).

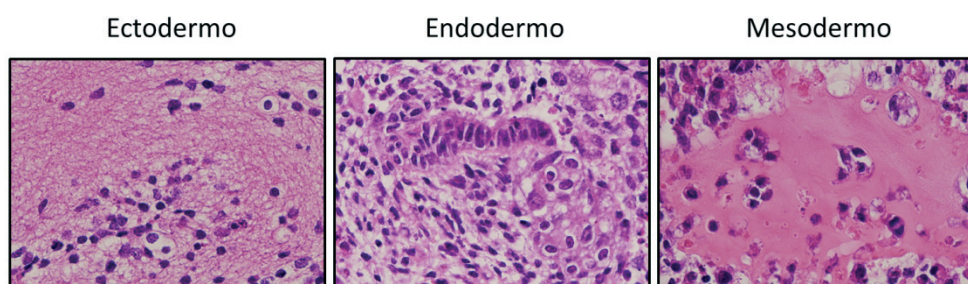


Figura 35. Os EBs de iPSCs procedentes de MEFs *Rb* ^{-/-} con 2F-OK presentan características histolóxicas de diferenciación das tres capas xerminais. Imaxes representativas de seccións da tinguidura H&E de EBs obtidos a partir de iPSCs xeradas de MEFs *Rb* ^{-/-} reprogramados con 2F-OK embebidos en parafina. Cada figura mostra exemplos de diferenciación das tres capas xerminais (ectodermo, endodermo e mesodermo).

Estes resultados mostran que a expresión desregulada de Sox2 en células carentes de *Rb* é suficiente para permitir a reprogramación celular a iPSCs sen a necesidade de Sox2 exógeno, demostrando así que este aumento da expresión ten consecuencias funcionais relevantes.

1.4. A eliminación parcial de células Sox2 positivas mitiga o fenotipo tumoral hipofisario causado pola perda de *Rb* en ratos

O xene SOX2 humano que se localiza no locus 3q26.3 está amplificado en varios tipos de cancro que inclúen glioblastoma, SCLC, e moitas formas de SCC (Weina, K. and Utikal, J., 2014). Non obstante, a implicación de Sox2 en cancro non se limita a tumores que presentan amplificación xénica de Sox2, senón que se abre a posibilidade de que outros mecanismos de regulación contribúan ao papel potencial que ten Sox2 en cancro. Neste sentido, estudos previos xa falan da contribución da expresión desregulada de Sox2 no desenvolvemento de tumores hipofisarios en ratos deficientes para *p27* (Li, H. et al., 2012). Os nosos resultados actuais son unha reminiscencia desta mesma situación. Polo tanto, quixemos determinar se a represión incompleta da expresión de Sox2 en células diferenciadas que perden *Rb* podería contribuír ao desenvolvemento tumoral. A heterocigosidade de *Rb* en ratos conduce ao desenvolvemento de tumores hipofisarios tras a perda estocástica do segundo alelo de *Rb* (Jacks, T. et al., 1992).

Tendo en conta os nosos resultados anteriores, decidimos medir a expresión de mRNA de Sox2 en hipófises pretumorais de ratos wt e *Rb*-heterocigotos (*Rb*-het) e observamos un modesto incremento da expresión de Sox2 nas hipófises procedentes de ratos heterocigotos para *Rb* (**Figura 36**), un dato consistente cos resultados que obtivemos anteriormente en MEFs carentes de *Rb* (**Figura 25**).

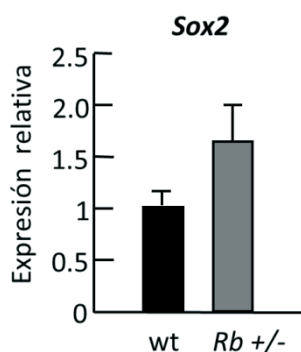


Figura 36. As hipófises dos ratos *Rb*-het presentan un incremento modesto da expresión de Sox2 con respecto ás hipófises de ratos wt. A figura mostra os niveis de mRNA de Sox2 en hipófises wt (n=4) e hipófises de ratos *Rb*-het (n=4).

Para tentar pescudar se as células Sox2 positivas contribúen á aparición destes tumores, empregamos un modelo de rato transxénico KI denominado rato Sox2-TK, que como mencionamos anteriormente alberga o xene da *Timidina Kinasa*

RESULTADOS

truncada (deltaTK) do HSV-1 no locus endógeno de Sox2 (Arnold, K. et al., 2011). Nun primeiro momento, co obxectivo de comprobar que o tratamento das células Sox2 positivas en división con GCV induce a morte celular destas, realizamos un experimento de reprogramación celular en MEFs Sox2^{WT} e Sox2^{TK} mediante a expresión ectópica de Oct4, Klf4 e Sox2 (3F-OXS), obtendo en ambos casos colonias de iPSCs. O tratamento das iPSCs Sox2^{TK} con 0.25 µg/mL de GCV durante 6 días resultou nunha apoptose masiva, o que nos permitiu validar o sistema *in vitro* (**Figura 37**).

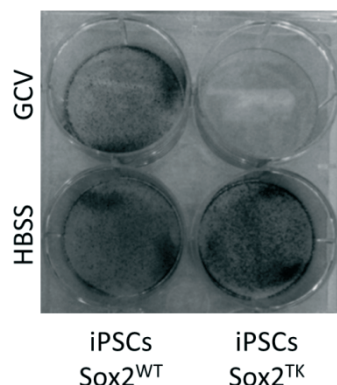


Figura 37. O tratamento de iPSCs Sox2^{TK} con GCV induce apoptose masiva *in vitro*. Imaxe da tinguidura Cristal violeta de iPSCs Sox2^{WT} e Sox2^{TK} despois de 6 días de tratamento con GCV (0.25 µg/mL) e HBSS (control).

O tratamento continuo con 100 mg/kg de GCV *in vivo* tradúcese na morte do animal despois de 1 ou 2 semanas. Non obstante, nós observamos que estes ratos Sox2-TK toleran unha inxección intraperitoneal de GCV cada dúas semanas dando lugar a varios graos de eliminación de células Sox2 positivas. En base a isto, xeramos ratos transxénicos Rb-het/Sox2-TK, que os sometemos a un protocolo repetitivo en canto á administración de GCV co fin de indagar se as células Sox2 positivas contribúen ao desenvolvemento dos tumores que son iniciados pola deficiencia de Rb (**Figura 38A**). Cando rematan os tratamentos con GCV os animais son sacrificados e os tecidos destes extraídos para a unha análise histolóxica posterior. O primeiro que fixemos foi medir as masas hipofisarias e observamos unha tendencia en canto ao tamaño das hipófises, pois as hipófises dos ratos Rb-het/Sox2-TK tratados con GCV son máis pequenas en comparación cas hipófises do grupo de ratos control tratados con HBSS (**Figura 38B**).

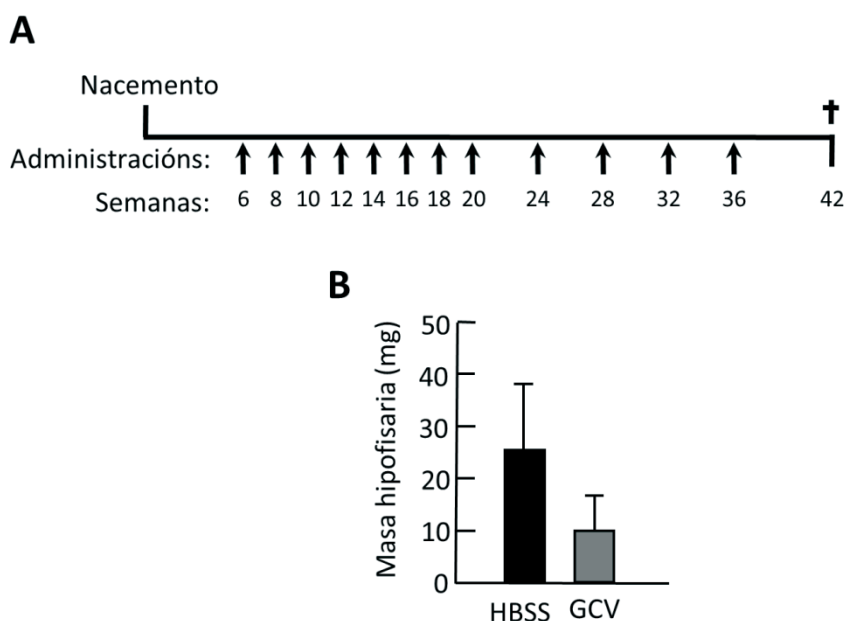


Figura 38. As hipófises dos ratos *Rb*-het/*Sox2*-TK tratados con GCV son máis pequenas que as hipófises do grupo de ratos control tratados con HBSS. **A**, representación esquemática do protocolo experimental co tratamento GCV (100 mg/kg) ou HBSS (control) nos ratos *Rb*-het/*Sox2*-TK. As inxeccións intraperitoneais administráronse nos tempos indicados (semanas) e os ratos sacrificáronse ás 42 semanas. **B**, nesta figura observamos as masas hipofisarias ($n=4$ para HBSS; $n=3$ para GCV) dos ratos *Rb*-het/*Sox2*-TK.

A continuación verificamos que producimos diferentes graos de eliminación das células *Sox2* positivas tras o tratamento con GCV, realizando unha inmunohistoquímica para *Sox2* en seccións procedentes de tecidos control, como son esófago e a traquea. A pesar do baixo número de animais analizados, observamos que cando a eliminación das células *Sox2* positivas foi eficiente, as hipófises dos ratos *Rb* $-/-$ mostraban unha morfoloxía normal, un número de células *Sox2* positivas reducido e unha baixa proliferación celular como podemos ver na inmunohistoquímica para Ki67 (**Figura 39**). En conxunto, estes datos confirman que a falta de *Rb* provoca unha desregulación *in vivo* de *Sox2* que ten consecuencias relevantes posto que conduce á aparición de tumores hipofisarios.

RESULTADOS

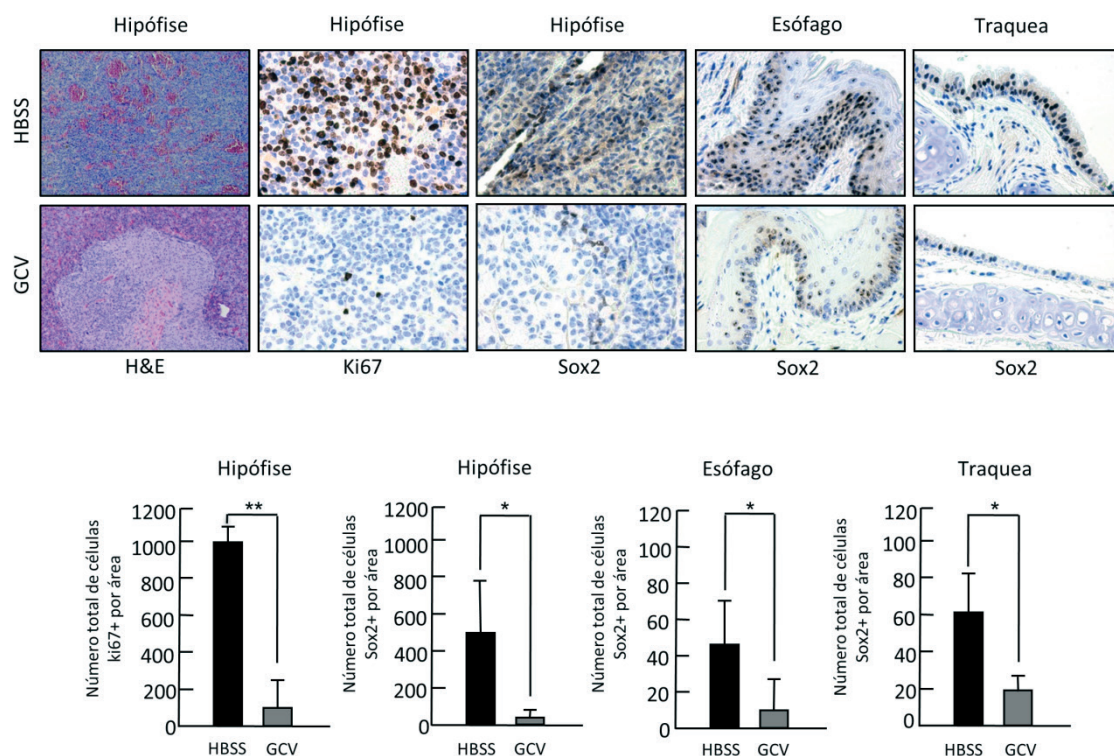


Figura 39. As hipófises dos ratos *Rb-het/Sox2-TK* tratados con GCV teñen unha morfoloxía normal, un número de células Sox2 positivas reducido e unha baixa proliferación celular. Imaxes representativas de seccións de parafina de tecidos de ratos *Rb-het/Sox2-TK* tratados con GCV (panel inferior) ou HBSS (panel superior). As tres primeiras filas de imaxes corresponden a seccións da hipófise tinguidas con H&E (10X) e as inmunohistoquímicas (40X) para o marcador de proliferación celular Ki67 e Sox2, respectivamente. As dúas últimas filas de imaxes corresponden a tecidos control, o esófago e a traquea tinguidas para Sox2 (40X). Na parte inferior, mostrase a cuantificación de Ki67 e de células Sox2 positivas. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2. REGULACIÓN DE SOX2 POR p53 EN CANCRO

Baseándonos nos resultados citados no primeiro capítulo que mostran que unha represión defectuosa da transcrición de Sox2 en ausencia de *Rb* ou *p130* resulta na expresión detectable duns niveis baixos, aínda que reproducibles, deste xene en MEFs e que a perda de *p53* conduce a maiores niveis de expresión de Sox2 só cando están previamente desregulados, xunto co coñecemento da implicación de Sox2 no proceso oncoxénico (Weina, K. and Utikal, J., 2014), levounos a investigar o papel de *p53* na regulación transcrricional de Sox2 en cancro.

2.1. A alteración dos niveis de p53 modula a expresión de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas

Estudos realizados no noso laboratorio mostraron que p53 xoga un papel importante na represión transcricional de Sox2 en MEFs deficientes para Rb ou p130 que xa mostran unha desregulación previa nos niveis deste xene. En base ao anteriormente mencionado e que Sox2 é coñecido por estar implicado en cancro (Weina, K. and Utikal, J., 2014), decidimos estudar en detalle a influencia de p53 na expresión de Sox2 en cancro. Para iso, alteramos os niveis de p53 en dúas liñas celulares de cancro de pulmón humano (H1299 e A549) e dúas liñas celulares de glioblastoma humano (U-373 MG e U-87 MG) que presentan diferentes graos de expresión de Sox2. As liñas celulares A549 e U-373 MG expresan niveis altos de Sox2 mentres H1299 e U-87MG expresan Sox2 minimamente ou mesmo son consideradas liñas celulares negativas para Sox2 (Ferletta, M. et al., 2011; Zhang, X. et al., 2013). Para levar a cabo este experimento, por un lado transfectamos a liña celular H1299, que posúe unha delección parcial homocigótica do xene TP53 e polo tanto, non expresa a proteína supresora de tumores p53 (Chang, C., 1996) e a liña celular U-373MG que ten unha mutación no codón 273 (R273H) deste xene e expresa unha proteína p53 mutante non funcional (Van Meir, E.G. et al., 1994) con p53 ectópico. Por outro lado, transducimos as células A549 e U-87MG, que teñen un estado de p53 wt (Jia, L.Q. et al., 1997; Van Meir, E.G. et al., 1994) cun shRNA contra p53 (shp53). Como podemos observar, a expresión ectópica de p53 foi quen de reducir os niveis de Sox2 nas células U-373MG tanto a nivel proteico (**Figura 40A**) como de mRNA (**Figura 40B**), mentres no caso das células H1299 esta redución nos niveis de Sox2 só a detectamos mediante qRT-PCR (**Figura 40B**). Pola contra, a diminución dos niveis de p53 mediante un shRNA nas células A549 e U-87MG provocou un incremento da expresión do mRNA de SOX2 estatisticamente significativo en ambos tipos celulares (**Figura 40B**), mentres a detección do aumento dos niveis proteicos de Sox2 por Western blot só foi posible no caso das células A549 (**Figura 40A**). En todos os tipos celulares, a presenza ou ausencia de p53 conduciu a un incremento ou redución, respectivamente, dos niveis proteicos e de mRNA do xene CDKN1A, un xene de resposta á activación transcricional de p53 que codifica para p21 e que empregamos como control nos nosos experimentos (**Figura 40A-B**). Estes resultados indican que a alteración dos niveis de p53 modula a expresión de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas.

RESULTADOS

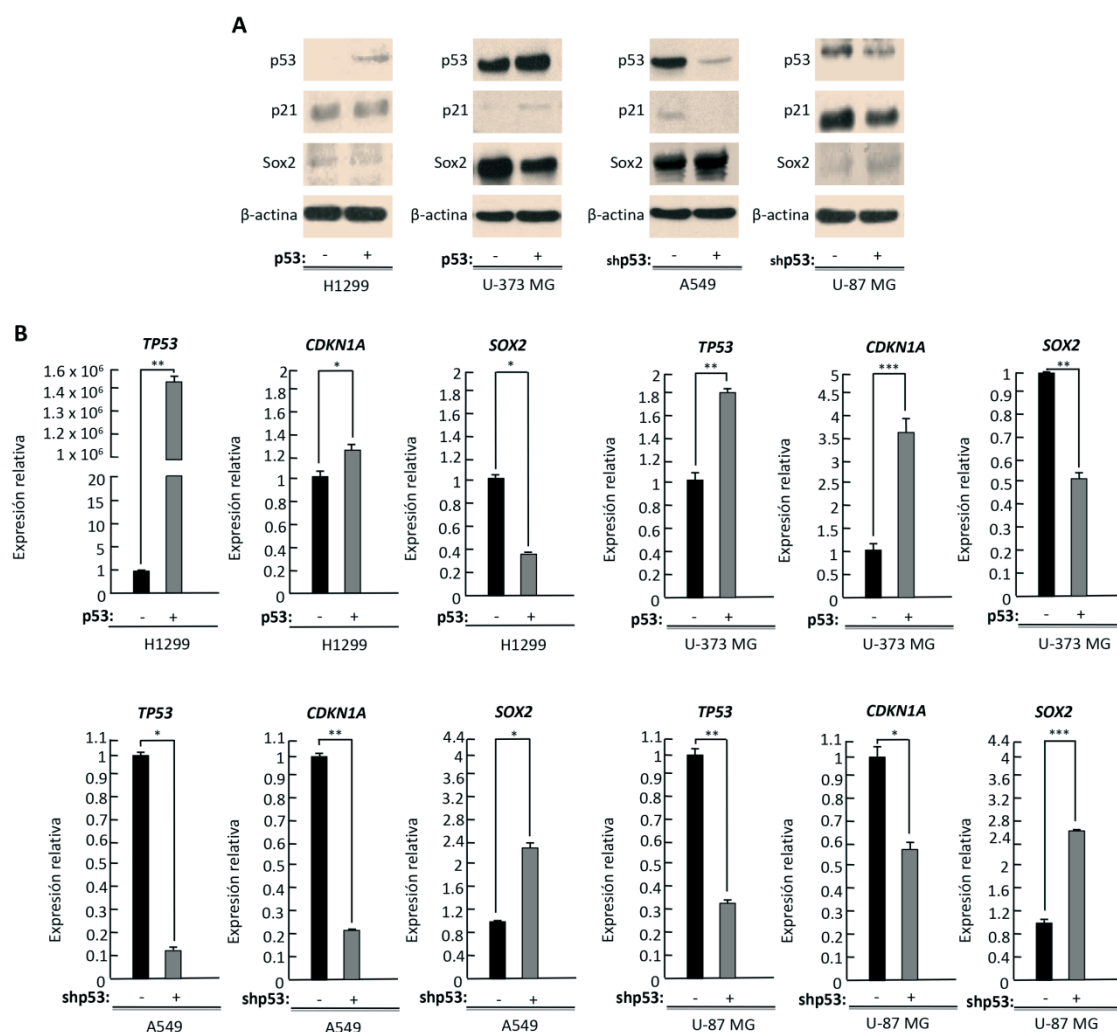


Figura 40. A alteración dos niveis de p53 modula a expresión de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas. **A**, análise da expresión de p53, p21 e Sox2 mediante Western blot en H1299 e U-373MG transfectadas con pcDNA3-p53 ou o vector baleiro e en A549 e U-87MG transducidas con pRetroSuper-Blast-shp53 ou o vector baleiro. **B**, os niveis de mRNA de *TP53*, *CDKN1A* e *SOX2* en H1299 e U-373MG transfectadas con pcDNA3-p53 ou o vector baleiro e A549 ou U-87MG transducidas con pRetroSuper-Blast-shp53 ou o vector baleiro medíronse mediante qRT-PCR. A significación estatística analízase mediante o test *t* de *Student* de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.2. A alteración dos niveis de p53 modula a actividade transcricional do promotor de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas

De seguido, para tentar determinar un posible efecto de p53 no promotor do xene Sox2, realizamos un ensaio luciferasa nas liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas anteriormente citadas. Para levar a cabo este ensaio

luciferasa tanto as células H1299 e U-373MG transfectadas con p53 ectópico como as A549 e U-87MG transducidas cun shp53 foron co-transfectadas co plásmido pGL3-Sox2 luc, que contén o xene da luciferasa do vagalume baixo o control do promotor de Sox2. Consistente cos resultados previamente mencionados, a expresión ectópica de p53 reprimiu a actividade luciferasa, é dicir, a actividade transcripcional do promotor de Sox2 nas células H1299 e U-373MG (**Figura 41**), mentres a redución dos niveis de p53 mediante un shRNA nas células A549 e U-87MG (**Figura 41**) incrementou de maneira significativa a actividade transcripcional deste. En todos os casos, as células tamén foron co-transfectadas co plásmido PG13-luc, un reporteiro luciferasa que contén 13 elementos de resposta a p53 en tándem derivados do promotor de p21, que se empregou como control (**Figura 41**). Polo tanto, estes resultados mostran que a alteración dos niveis de p53 modula a actividade transcripcional do promotor de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas.

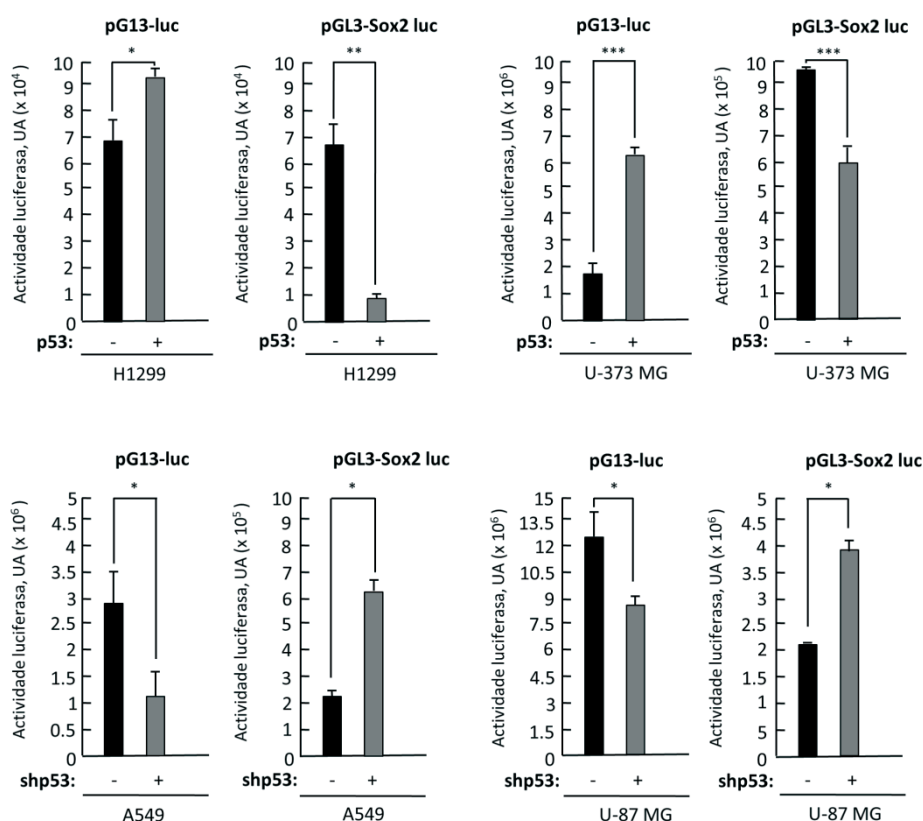


Figura 41. A alteración dos niveis de p53 modula a actividade transcripcional do promotor de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón e glioblastoma humanas. A actividade transcripcional do promotor de Sox2 mediuse mediante un ensaio de luciferasa. As liñas celulares H1299 e U-373MG transfectadas con pcDNA3-p53 ou o vector baleiro máis as liñas celulares A549 e U-87MG transducidas con pRetroSuper-Blast-shp53 ou o vector baleiro foron co-transfec-

RESULTADOS

tadas co plásmido pGL3-Sox2 luc, no cal o xene da luciferasa do vagalume está baixo o control do promotor Sox2. En todos os tipos celulares, úsase o plásmido pG13-luc como control positivo. A actividade luciferasa que se expresa en Unidades Arbitrarias (UA) está normalizada con respecto á actividade β -galactosidasa. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.3. A indución de p53 por Doxorrubicina, reprime a expresión de Sox2 en dúas liñas celulares de glioblastoma de rato

Para corroborar a influencia de p53 na expresión de Sox2 en cancro, realizamos un experimento onde inducimos a expresión de p53 mediante o tratamento con Doxorrubicina, un potente axente xenotóxico, en dúas liñas celulares de glioblastoma de rato (T653 e T731) que expresan Sox2 e teñen un estado de p53 wt (Seoane, M. et al., 2008). Tras o tratamento con Doxorrucibina durante 4, 6, 8 e 10 horas, os extractos proteicos de ambas liñas celulares de glioblastoma foron recoillidos e analizados mediante Western blot. Como podemos observar na **Figura 42A**, o tratamento con Doxorrubicina incrementa os niveis proteicos de p53 ao igual que os da súa diana, p21, e reduce os de Sox2 dunha forma dependente do tempo. Para determinar ademais, se a indución de p53 afecta á expresión de Sox2 a nivel transcricional medimos os niveis de mRNA de Sox2 mediante qRT-PCR, e observamos que efectivamente os niveis de mRNA de Sox2 tamén se atopan reducidos tras o tratamento con Doxorrubicina a diferentes tempos (**Figura 42B**). Analogamente, os niveis de mRNA de *Cdkn1a*, o xene diana de p53, atópanse incrementados tras a indución de p53 por este tratamento (**Figura 42B**). Estes resultados indican que a indución de p53 por un axente que dana o DNA, como a Doxorrubicina, reprime a expresión de Sox2 en dúas liñas celulares de glioblastoma de rato.

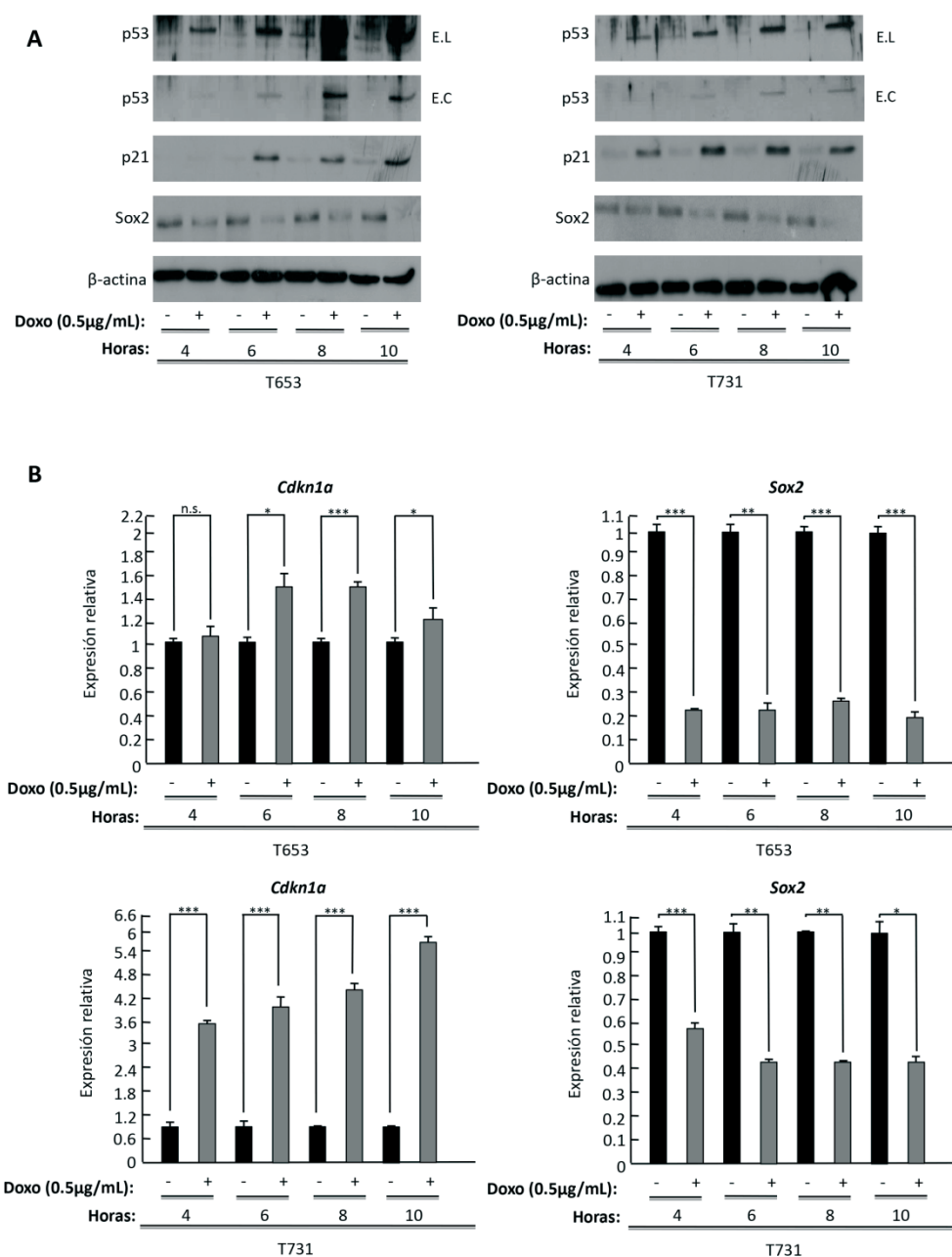


Figura 42. A indución de p53 por Doxorubicina, reprime a expresión de Sox2 en dúas liñas celulares de glioblastoma de rato. **A**, análise da expresión de p53, p21 e Sox2 mediante Western blot nas células de glioblastoma de rato T653 (esquerda) e T731 (dereita) tratadas con 0.5 µg/mL de Doxorubicina (Doxo) durante 4, 6, 8 e 10 horas. E.L e E.C: exposición longa e curta, respectivamente. **B**, os niveis de mRNA de *Cdkn1a* e *Sox2* nas células de glioblastoma de rato T653 (panel superior) e T731 (panel inferior) tratadas con 0.5 µg/mL de Doxorubicina (Doxo) durante 4, 6, 8 e 10 horas medíronse mediante qRT-PCR. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.4. A ausencia de p53 bloquea a represión de Sox2 despois do tratamento con Doxorrubicina nas dúas liñas celulares de glioblastoma de rato

Tendo en conta os resultados anteriores e que ambas liñas celulares de glioblastoma de rato teñen un estado de p53 wt, o seguinte que nos preguntamos foi se a ausencia de p53 nestas células sería capaz de bloquear a represión de Sox2 tras a indución de p53 co tratamento de Doxorrubicina. Para responder a esta pregunta, decidimos transducir as células T653 e T731 cun shRNA contra p53 e posteriormente inducir p53 con Doxorrubicina durante 10 horas. Ao igual que acontecía no apartado anterior, a indución de p53 mediante Doxorrubicina durante 10 horas en ambas liñas celulares de glioblastoma de rato transducidas co vector baleiro reducía os niveis de Sox2 tanto a nivel proteico (**Figura 43A**) como de mRNA (**Figura 43B**). Non obstante, o tratamento con Doxorrubicina das células T653 e T731 transducidas co shp53 non é capaz de inducir p53 e polo tanto, os niveis proteicos (**Figura 43A**) e de mRNA (**Figura 43B**) de Sox2 non se reducen de maneira significativa con respecto ás células non tratadas. Este resultado suxire que a falta de p53 impide a represión de Sox2 tras o tratamento con Doxorrubicina en ambas liñas celulares de glioblastoma de rato.



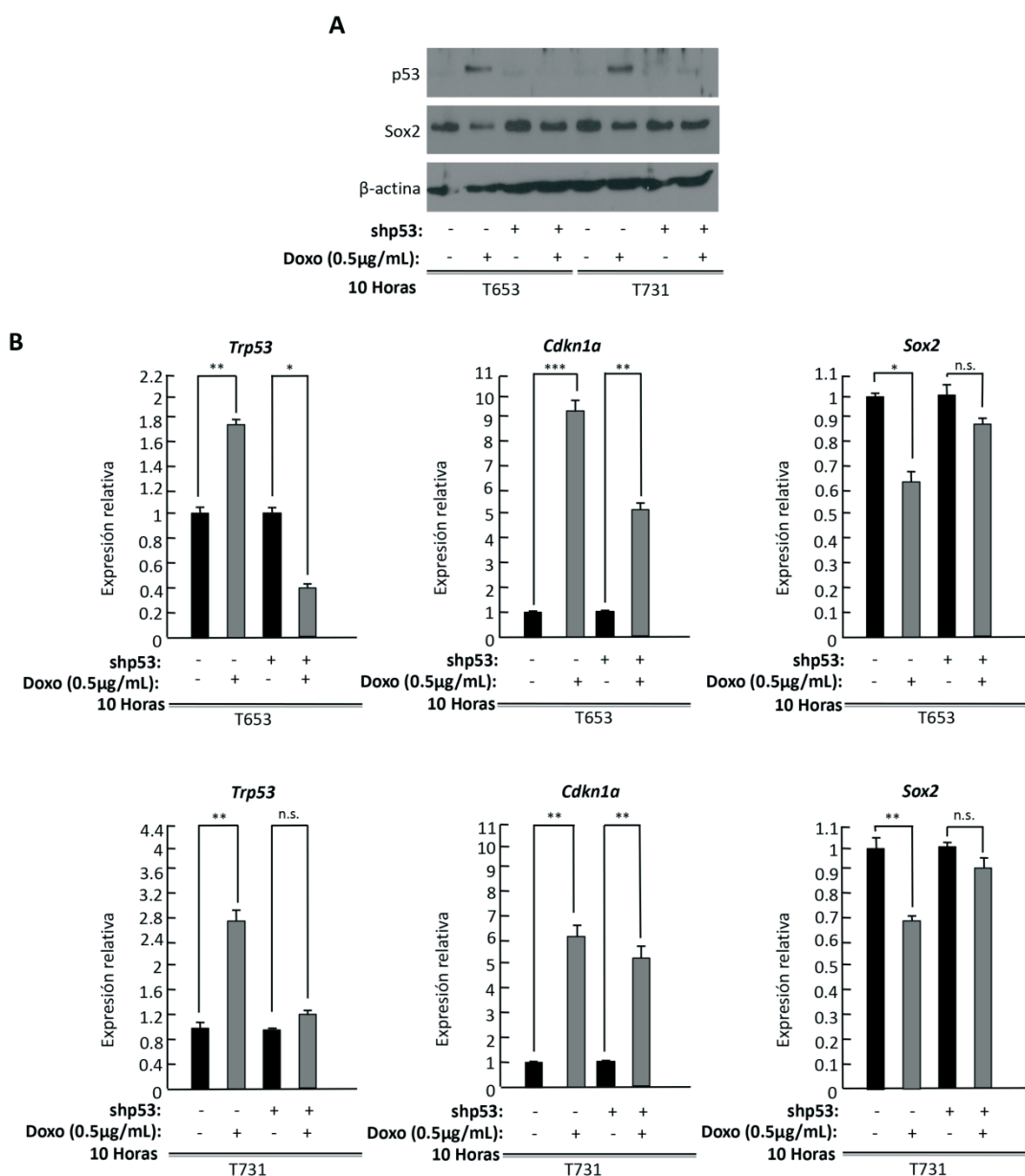


Figura 43. A ausencia de p53 bloquea a represión de Sox2 despois do tratamento con Doxorrubicina nas dúas liñas celulares de glioblastoma de rato. **A**, análise da expresión de p53 e Sox2 mediante Western blot nas células de glioblastoma de rato T653 (esquerda) e T731 (dereita) transducidas con MSCV PIG-shp53 ou o vector baleiro e tratadas con 0.5 μg/mL de Doxorrubicina (Doxo) durante 10 horas. **B**, os niveis de mRNA de *Trp53*, *Cdkn1a* e *Sox2* nas células de glioblastoma de rato T653 (panel superior) e T731 (panel inferior) transducidas con MSCV PIG-shp53 ou o vector baleiro e tratadas con 0.5 μg/mL de Doxorrubicina (Doxo) durante 10 horas medíronse mediante qRT-PCR. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.5. p53 únese ao promotor e a dúas rexións reguladoras de Sox2 denominadas *enhancer* SRR1 e SRR2

Co obxectivo de determinar se p53 se une ao promotor ou a algunha das dúas rexións reguladoras de Sox2 implicadas na expresión de Sox2 en ESCs e outros tipos celulares (Miyagi, S. et al., 2004; Tomioka, M. et al., 2002), denominadas *enhancer* SRR1 e SRR2, realizamos un ChIP empregando extractos procedentes da liña celular de glioblastoma de rato T731 tratada con Doxorrubicina durante 10 horas. A realización do ChIP co anticorpo contra p53 seguido da qRT-PCR para cuantificar a presenza do promotor ou os *enhancers* Sox2-SRR1 e SRR2 nos inmunoprecipitados mostrou que aparentemente p53 está asociado tanto ao promotor como a ambos *enhancers* (**Figura 44**). A detección do *enhancer* Sox2-SRR2 realizouse empregando dous pares diferentes de oligonucleótidos que nos mostrou resultados similares. A detección do promotor de *p21*, un promotor dun xene diana de p53, nos inmunoprecipitados serviunos como control positivo da indución de p53 tras o tratamento con Doxorrubicina. Estes resultados parecen indicar que p53 únese tanto ao promotor como ás dúas rexións reguladoras de Sox2, o *enhancer* Sox2-SRR1 e SRR2.

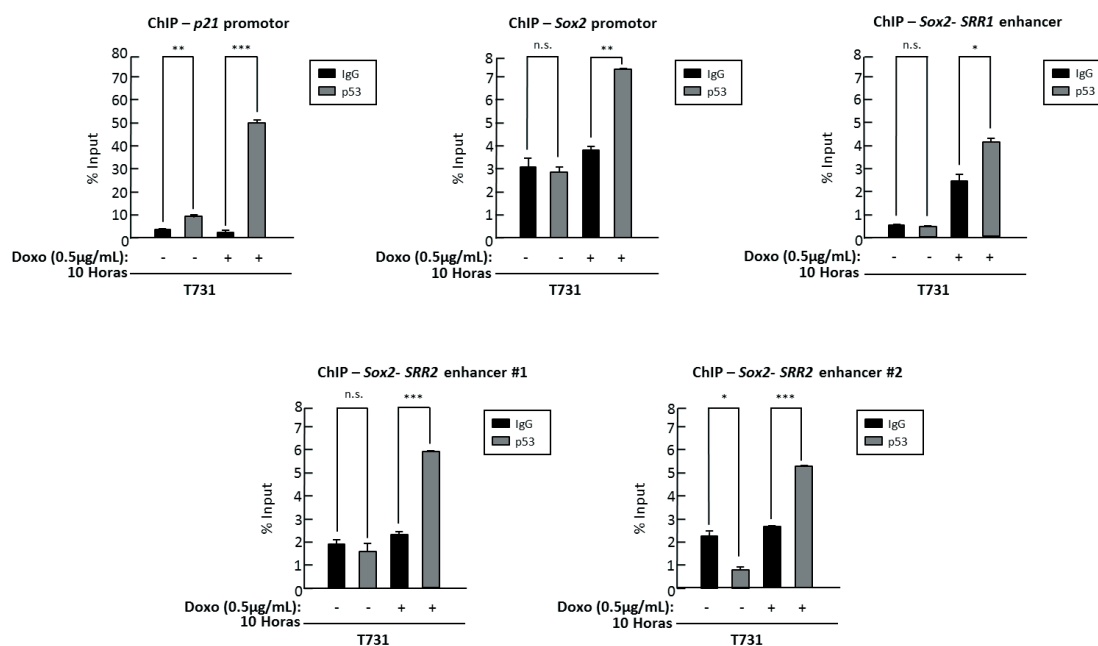


Figura 44. p53 únese ao promotor e a dúas rexións reguladoras de Sox2 denominadas *enhancer* Sox2-SRR1 e SRR2. ChIP de p53 no promotor e dúas rexións reguladoras de Sox2 (Sox2-SRR1 e SRR2) de células T731 tratadas con 0.5 µg/mL Doxorrubicina durante 10 horas. Para a detección do *enhancer* Sox2-SRR2 empregáronse dous pares diferentes de oligonucleótidos. O ChIP control utilizou oligonucleótidos que amplifican o promotor de *p21*. En todos os casos, empregouse o anticorpo IgG como control negativo e os valores están normalizados con respecto ao input. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.6. Xeración de liñas celulares tumorais con niveis incrementados de Sox2

Varios estudos mostraron que Sox2 contribúe aos procesos fisiolóxicos ou patofisiolóxicos das células cancerixenas (Weina, K. and Utikal, J., 2014), polo que decidimos estudar o efecto que tería o incremento dos niveis de Sox2 en dúas liñas celulares tumorais denominadas A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) e MCF7 (adenocarcinoma de mama humano). Co obxectivo de aumentar os niveis de Sox2 en ambas liñas celulares tumorais, decidimos levar a cabo dúas estratexias experimentais. Por unha parte, as células A549 e MCF7 foron transducidas cun repoteiro que xa empregamos anteriormente denominado EOS-GFP, que contén un promotor activo derivado dun transposon temperá de rato (ETn) que é específico para células nai pluripotentes indiferenciadas, en combinación con motivos de unión para Oct4 e Sox2 (EOS) (Hotta, A. et al., 2009). Ademais de ser un repoteiro transcricional de pluripotencia, observouse que un repoteiro EOS-GFP moi similar ao empregado por nós tamén se activa en liñas celulares de cancro de mama (Iglesias, J.M. et al., 2014). Trás a selección co antibiótico puromicina observamos a presenza deste plásmido na maioría das células mediante a visualización de GFP no microscopio de fluorescencia (**Figura 45A**). Para cuantificar o número de células que expresan GFP e os seus niveis de expresión, realizamos unha análise mediante citometría de fluxo que nos confirmou esta observación visual. Como mostramos na **Figura 45B**, despois da selección con puromicina a proporción de células positivas para GFP (29.9% en A549 EOS-GFP fronte a 94.9% en A549 EOS-GFP seleccionadas e 21.1% en MCF7 EOS-GFP fronte a 97.7% en MCF7 EOS-GFP seleccionadas) e a intensidade da expresión de GFP (fluorescencia media de 26.1 en A549 EOS-GFP fronte a 516.10 en A549 EOS-GFP seleccionadas e 13.6 en MCF7 EOS-GFP fronte a 625.2 en MCF7 EOS-GFP seleccionadas) incrementouse en ambos tipos celulares. Polo tanto, tras a selección co antibiótico o repoteiro EOS-GFP marca unha poboación homoxénea de células tumorais de A549 e MCF7 que aparentemente é máis positiva para Sox2.

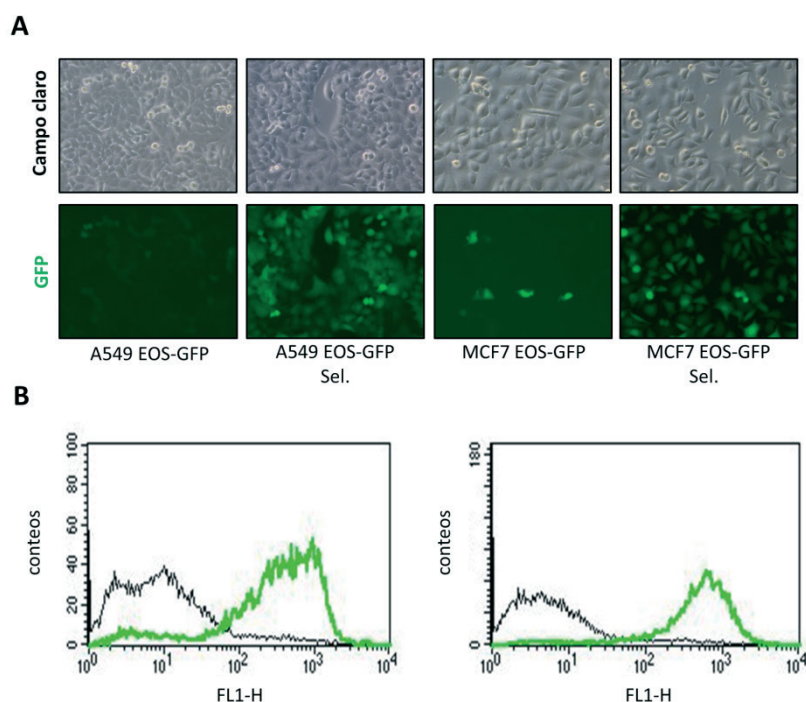


Figura 45. O reporteiro EOS-GFP marca unha poboación homoxénea de células tumorais de A549 e MCF7 aparentemente máis positiva para Sox2 tras a selección co antibiótico puromicina. **A**, imaxes representativas de campo claro (paneis superiores) e de fluorescencia para detectar a expresión de GFP (paneis inferiores) a 20X das liñas celulares A549 (esquerda) e MCF7 (dereita) transducidas co reporteiro EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 µg/mL de puromicina durante 3 días. **B**, gráficas que mostran a análise dos niveis de expresión de GFP mediante citometría de fluxo do plásmido EOS-GFP introducido en A549 EOS-GFP (esquerda) ou MCF7 EOS-GFP (dereita) (liña negra) e A549 EOS-GFP seleccionadas (esquerda) ou MCF7 EOS-GFP seleccionadas (dereita) (liña verde). A configuración axustouse previamente considerando as células A549 ou MCF7 sen o plásmido EOS como GFP negativo.

Por outro lado, outra das estratexias experimentais que empregamos para incrementar os niveis de Sox2 nas liñas celulares A549 e MCF7 foi a sobreexpresión de Sox2. Para levar a cabo este experimento transducimos ambas liñas celulares con dous vectores diferentes que permiten sobreexpresar Sox2 de forma ectópica, o pMXs-Sox2-IP e o pLV-tetO-Sox2. Neste último caso, pLV-tetO-Sox2 é un vector lentiviral inducible que contén un promotor dependente de tetraciclina (TetOP) seguido da rexión que codifica para Sox2, polo que require a co-transdución co vector FUW-M2rtTA, que codifica un transactivador reverso dependente de tetraciclina, e a adición de doxíciclina (un análogo da tetraciclina) para a indución da expresión de Sox2 (Stadtfeld, M. et al., 2008). Dado que este vector presentaba unhas pequenas fugas de expresión, como control, utilizamos as células transducidas só co vector pLV-tetO-Sox2 omitindo o vector FUW-M2rtTA e a adición de doxíciclina.

Para verificar que tanto as células A549 e MCF7 transducidas co vector EOS-GFP seleccionadas con puromicina como cos vectores de sobreexpresión de Sox2 anteriormente mencionados expresaban maiores niveis de Sox2, analizamos os extractos proteicos recollidos mediante Western blot. Como podemos observar na **Figura 46A**, as células A549 e MCF7 EOS-GFP seleccionadas presentan un lixeiro incremento dos niveis proteicos de Sox2 con respecto ás células sen seleccionar. O aumento dos niveis da proteína Sox2 é máis notable no caso das células transducidas cos vectores de sobreexpresión pMXs-Sox2-IP e pLV-tetO-Sox2 (**Figura 46A**). Os niveis de mRNA de SOX2 tamén se determinaron mediante qRT-PCR (**Figura 46B**), onde en todos os casos detectouse un incremento estatisticamente significativo dos niveis de SOX2 con respecto aos controis. Para a detección do mRNA de SOX2 nas células A549 e MCF7 EOS-GFP utilizouse un par de oligonucleótidos específicos para SOX2 endógeno. Polo tanto, estes resultados mostran que ambas estratexias experimentais incrementaron os niveis proteicos e de mRNA de Sox2 nas liñas celulares A549 e MCF7.



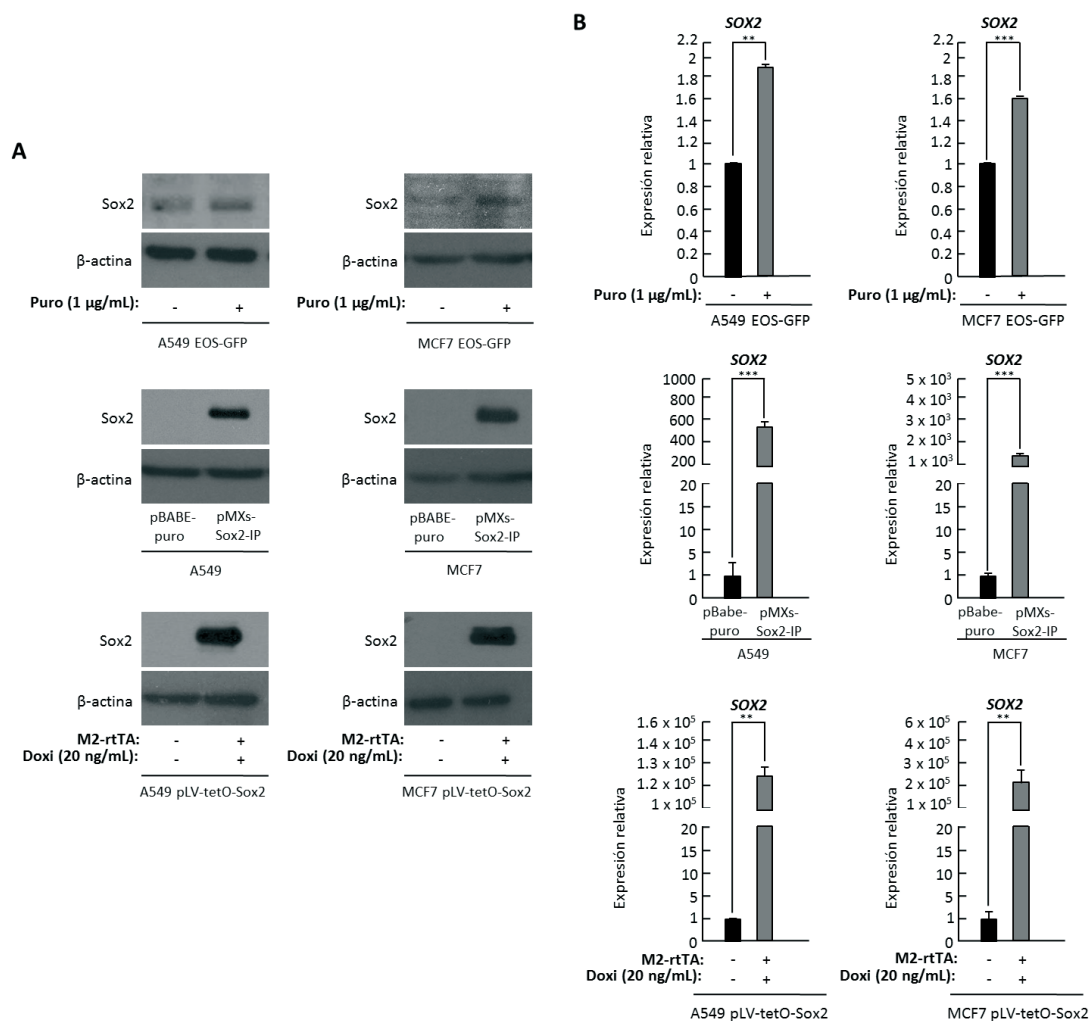


Figura 46. Incremento dos niveis de Sox2 en células A549 e MCF7 EOS-GFP seleccionadas ou transducidas con pMXs-Sox2-IP e pLV-tetO-Sox2. **A**, análise da expresión Sox2 mediante Western blot nas células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 µg/mL de puromicina (panel superior), con pMXs-Sox2-IP (panel do medio) e pLV-tetO-Sox2 (panel inferior) cos seus respectivos controis. **B**, os niveis de mRNA de SOX2 nas células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 µg/mL de puromicina (panel superior), con pMXs-Sox2-IP (panel do medio) e pLV-tetO-Sox2 (panel inferior) cos seus respectivos controis medíronse mediante qRT-PCR. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.7. O incremento dos niveis de Sox2 reduce a proliferación celular

O primeiro que nos cuestionamos foi se o incremento dos niveis de Sox2 tería algún efecto na capacidade proliferativa de ambas liñas celulares tumorais. Para levar a cabo este estudo, realizouse un ensaio de proliferación celular que consistiu en contar manualmente o número total de células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e os dous vectores de sobreexpresión de Sox2 cos seus respectivos controis ás 24, 48 e 72 horas de ser sementadas. Como mostra a **Figura 47**, o incremento dos niveis de Sox2 diminúe de forma significativa a proliferación celular en todos os casos. Estes resultados mostran, polo tanto, que a capacidade proliferativa das células A549 e MCF7 vese reducida tras un aumento dos niveis de Sox2.

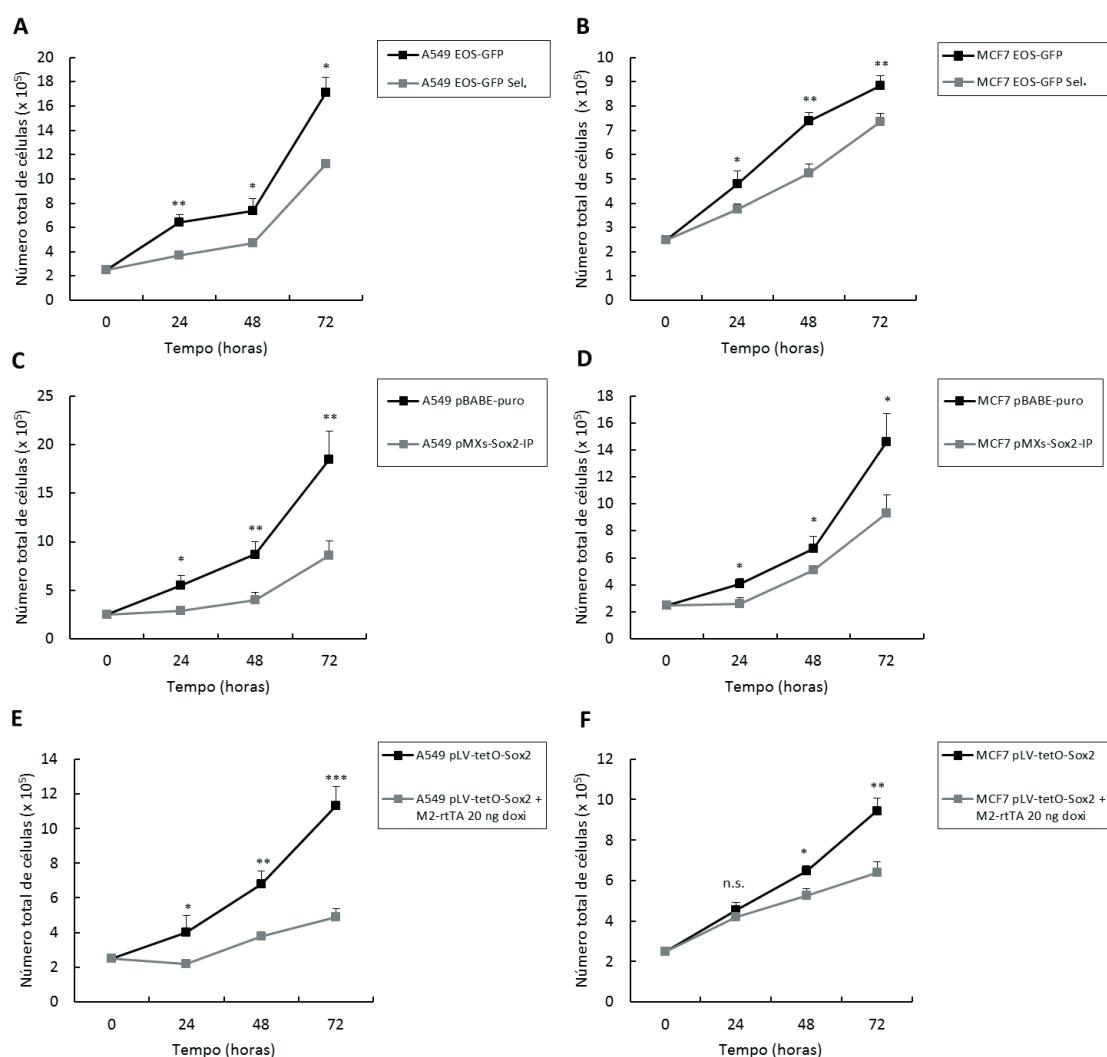


Figura 47. O incremento dos niveis de Sox2 reduce a proliferación celular. Curvas de crecemento do ensaio de proliferación celular das células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina (A e B), con pMXs-Sox2-IP (C e D) e pLV-tetO-Sox2 (E e F) cos seus respectivos controis ás 24, 48 e 72 horas de ser sementadas. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.8. O incremento dos niveis de Sox2 diminúe a capacidade de formación de colonias

Dado que os resultados do apartado anterior indican que un incremento dos niveis de Sox2 reduce a proliferación celular en A549 e MCF7, decidimos realizar un ensaio de formación de colonias que mide a capacidade das células en cultivo para crecer e dividirse en grupos. Aos 14 días de ser sementadas as células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e os dous vectores de sobreexpresión de Sox2 cos seus respectivos controis a baixa densidade (2000 ou 4000 células) realizou-se unha tinguidura con Cristal violeta e a cuantificación das colonias tal e como especificamos no apartado 14. *Ensaio de formación de colonias e 16. Tinguidura con Cristal violeta* de Material e Métodos. Como podemos observar na **Figura 48**, o aumento dos niveis de Sox2 reduciu de maneira significativa a formación de colonias en todos os casos (**Figura 48B-C-D-E-F**), agás nas células A549 transducidas con EOS-GFP onde non se detectaron diferenzas (**Figura 48A**). Polo tanto, estes resultados indican que a capacidade de formación de colonias das células A549 e MCF7 diminúe tras un aumento dos niveis de Sox2.



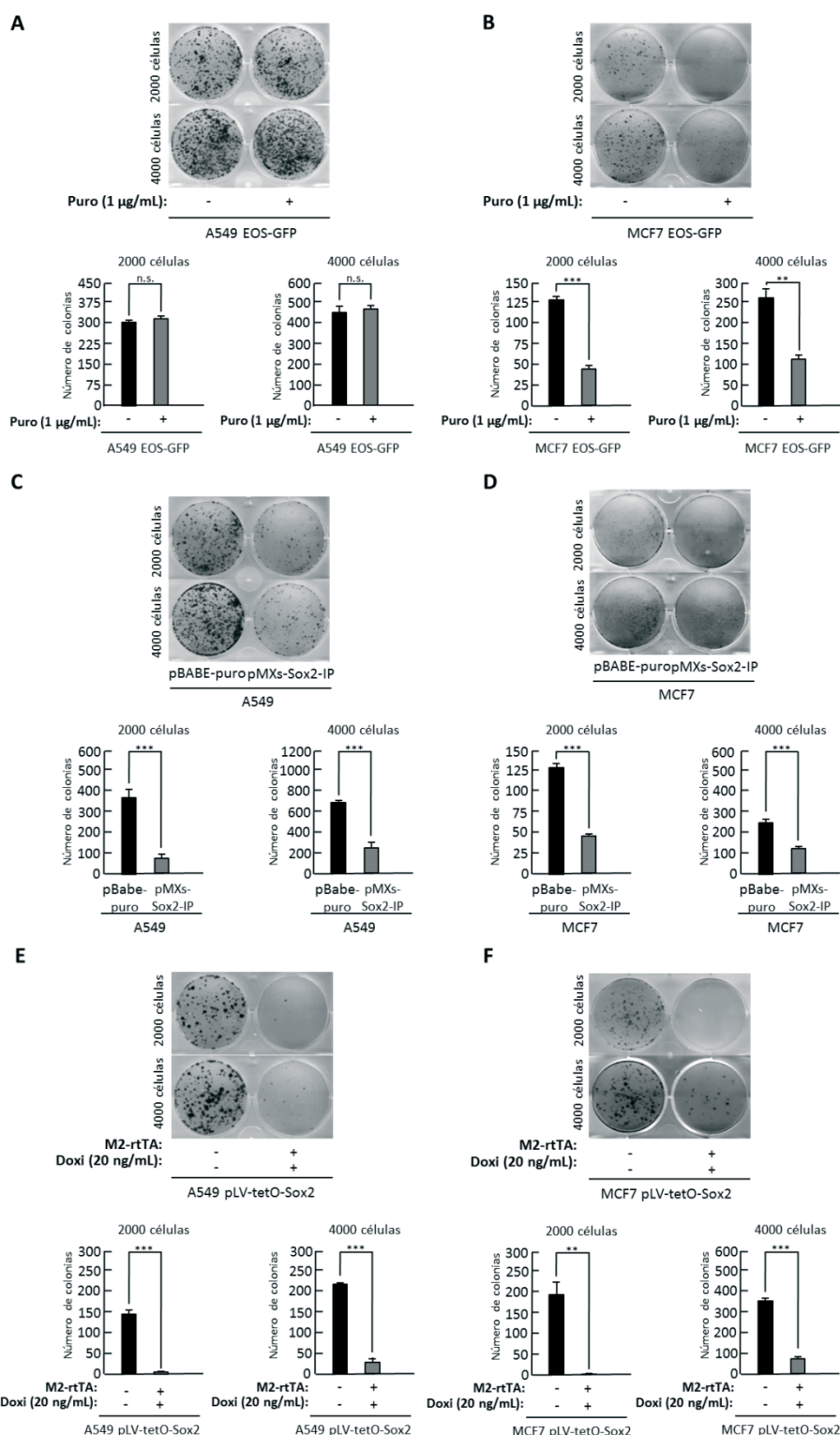


Figura 48. O incremento dos niveis de Sox2 diminúe a capacidade de formación de colonias. A capacidade das células en cultivo para crecer e dividirse en grupos avalíase mediante a realización dun ensaio de formación de colonias. Imaxes da tinguadura Cristal violeta e gráficas que mostran o número de colonias das células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1

RESULTADOS

$\mu\text{g/mL}$ de puromicina (A e B), con pMXs-Sox2-IP (C e D) e pLV-tetO-Sox2 (E e F) cos seus respectivos controis aos 14 días de ser sementadas a baixa densidade (2000 ou 4000 células). A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

2.9. O incremento dos niveis de Sox2 promove o proceso de EMT

Curiosamente, como mostramos na **Figura 49**, a sobreexpresión ectópica de Sox2 nas células A549 e MCF7 provocou certos cambios nas características morfolóxicas destas. Estes cambios caracterizáronse principalmente por unha distribución dispersa das células en cultivo e unha morfoloxía en forma de fuso ou estrela típica do tipo celular mesenquimal. Cabe destacar que estes cambios morfolóxicos non foron tan acentuados no caso das células A549 e MCF7 EOS-GFP seleccionadas (**Figura 45A**), seguramente debido a que o incremento dos niveis proteicos e de mRNA de Sox2 que presentan estas células é moi inferior con respecto ao de sobreexpresión (**Figura 46**).

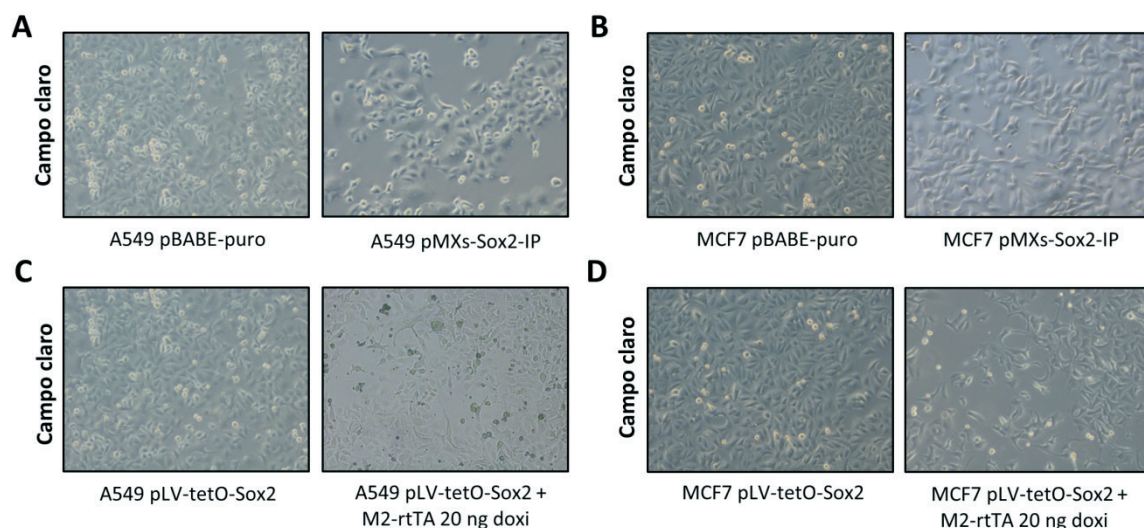


Figura 49. A sobreexpresión de Sox2 provoca cambios morfolóxicos cara un fenotipo celular máis mesenquimal. Imaxes representativas de campo claro a 10X da morfoloxía celular das células A549 (A) e MCF7 (B) transducidas con pMXs-Sox2-IP e A549 (C) e MCF7 (D) transducidas con pLV-tetO-Sox2 e os seus respectivos controis.

Tendo en conta que a diminución da proliferación celular e os cambios observados anteriormente, onde as células de tipo epitelial se converten en células cunha aparencia máis mesenquimal, son fenotipos característicos dun proceso denominado EMT (Evdokimova, V. et al., 2009; Kalluri, R. and Weinberg, R.A., 2009; Vega, S. et al., 2004), decidimos estudar o efecto de Sox2 no proceso de EMT mediante a avaliación da expresión de xenes clásicos implicados neste. En primeiro lugar, analizamos mediante Western blot a expresión proteica dun marcador epitelial (E-cadherina) e un mesenquimal (Vimentina) nas células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e ambos vectores de sobreexpresión. Como podemos

observar na **Figura 50**, sorprendentemente, só se detectaron os niveis proteicos de Vimentina nas células A549 e de E-cadherina nas MCF7. O incremento dos niveis de Sox2 conduciu a un aumento da expresión do marcador mesenquimal, Vimentina, nas células A549 EOS-GFP seleccionadas ou transducidas co vector de sobreexpresión pMXs-Sox2-IP. De maneira contraria e inesperada, os niveis de Vimentina nas células A549 transducidas con pLV-tetO-Sox2 estaban diminuídos. No caso da E-cadherina, o aumento dos niveis de Sox2 provocou unha diminución deste marcador epitelial nas células MCF7 onde Sox2 se sobreexpresou pero non no caso das células MCF7 EOS-GFP seleccionadas, que curiosamente, presentan un incremento deste.

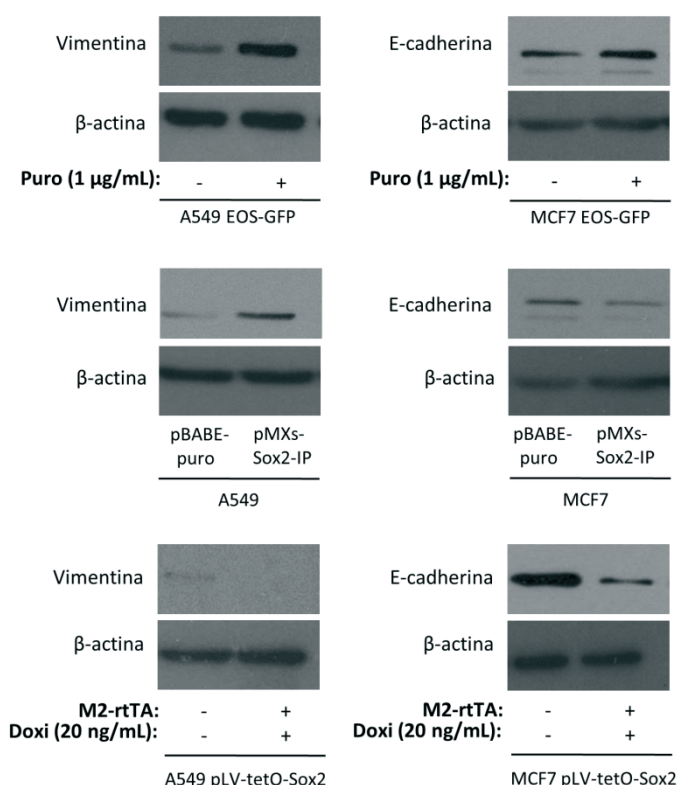


Figura 50. O incremento dos niveis de Sox2 altera a expresión proteica de E-cadherina e Vimentina. Análise da expresión de Vimentina (esquerda) e E-cadherina (dereita) mediante Western blot nas células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 μ g/mL de puromicina (panel superior), con pMXs-Sox2-IP (panel do medio) e pLV-tetO-Sox2 (panel inferior) cos seus respectivos controis.

Para reafirmar os resultados obtidos por Western blot, posteriormente analizamos os niveis de mRNA de CDH1 (E-cadherina) e VIM (Vimentina) mediante qRT-PCR (**Figura 51**). Neste caso, os niveis de mRNA dos dous marcadores detectouse en ambas liñas celulares. Na **Figura 51**, podemos ver como o incremento de Sox2 aumenta os niveis de VIM de maneira significativa en todos os casos, agás nas células MCF7 EOS-GFP seleccionadas (**Figura 51B**) e A549 transducidas con pLV-tetO-

RESULTADOS

Sox2 (**Figura 51E**), onde curiosamente, diminúen. Os niveis de mRNA do marcador epitelial *CDH1*, atópanse diminuídos de forma estatisticamente significativa tras o incremento dos niveis de Sox2, excepto nas células MCF7 EOS-GFP seleccionadas (**Figura 51B**), onde os niveis deste se atopan aumentados con respecto ao control.

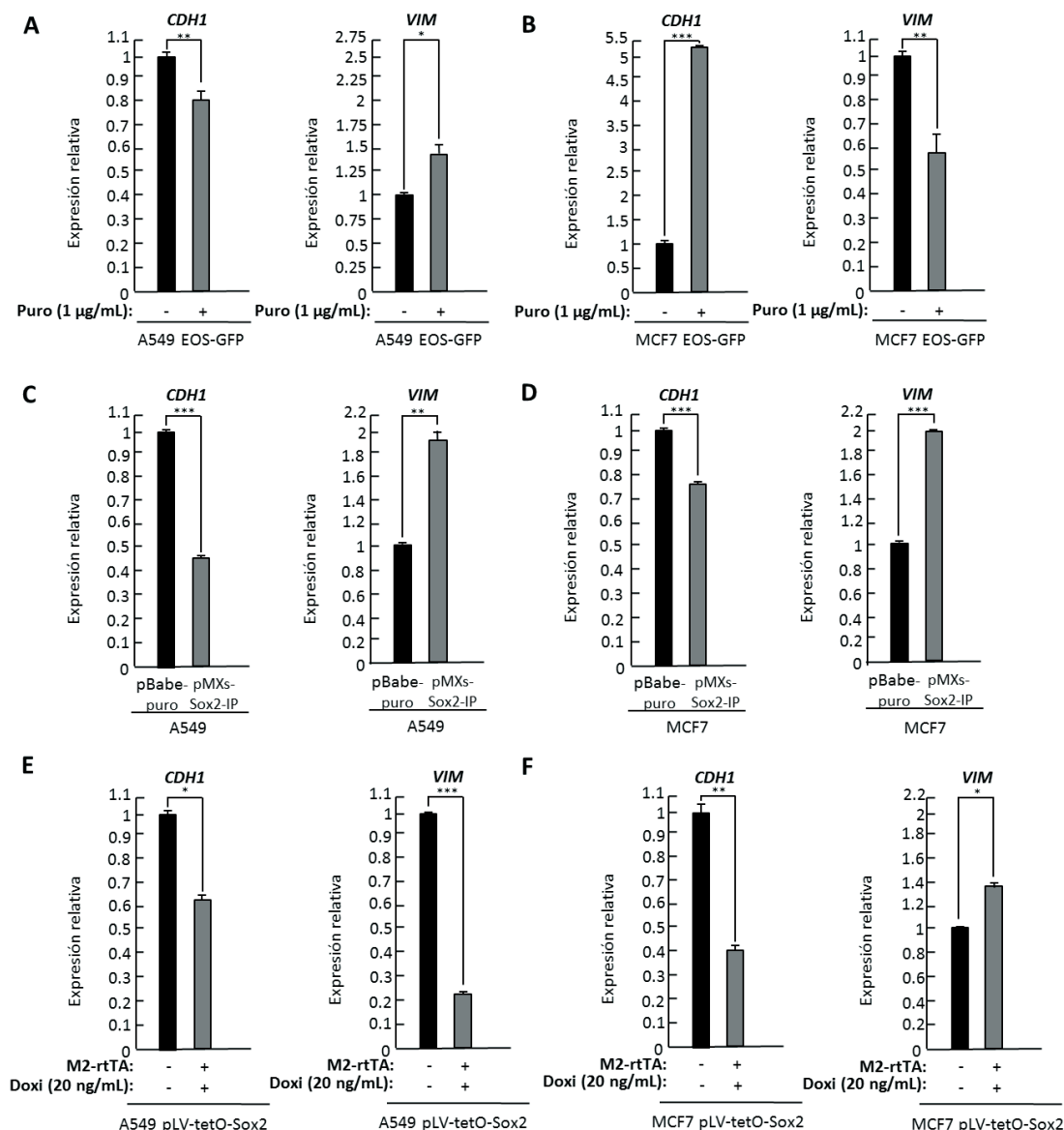


Figura 51. O incremento dos niveis de Sox2 altera os niveis de mRNA de *CDH1* e *VIM*. Os niveis de mRNA de *CDH1* e *VIM* nas células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 µg/mL de puromicina (A e B), con pMXs-Sox2-IP (C e D) e pLV-tetO-Sox2 (E e F) cos seus respectivos controis medíronse mediante unha análise de expresión Taqman. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

Ademais dos marcadores mencionados anteriormente, tamén analizamos mediante qRT-PCR, a expresión de xenes implicados funcionalmente no proceso de EMT como *SNAIL1*, *SNAIL2* e *TWIST1* (**Figura 52**). Tal e como mostra a **Figura 52**, en maior ou menor medida, os niveis de mRNA dos tres xenes incrementáronse tras o aumento da expresión de Sox2 en ambas liñas celulares.

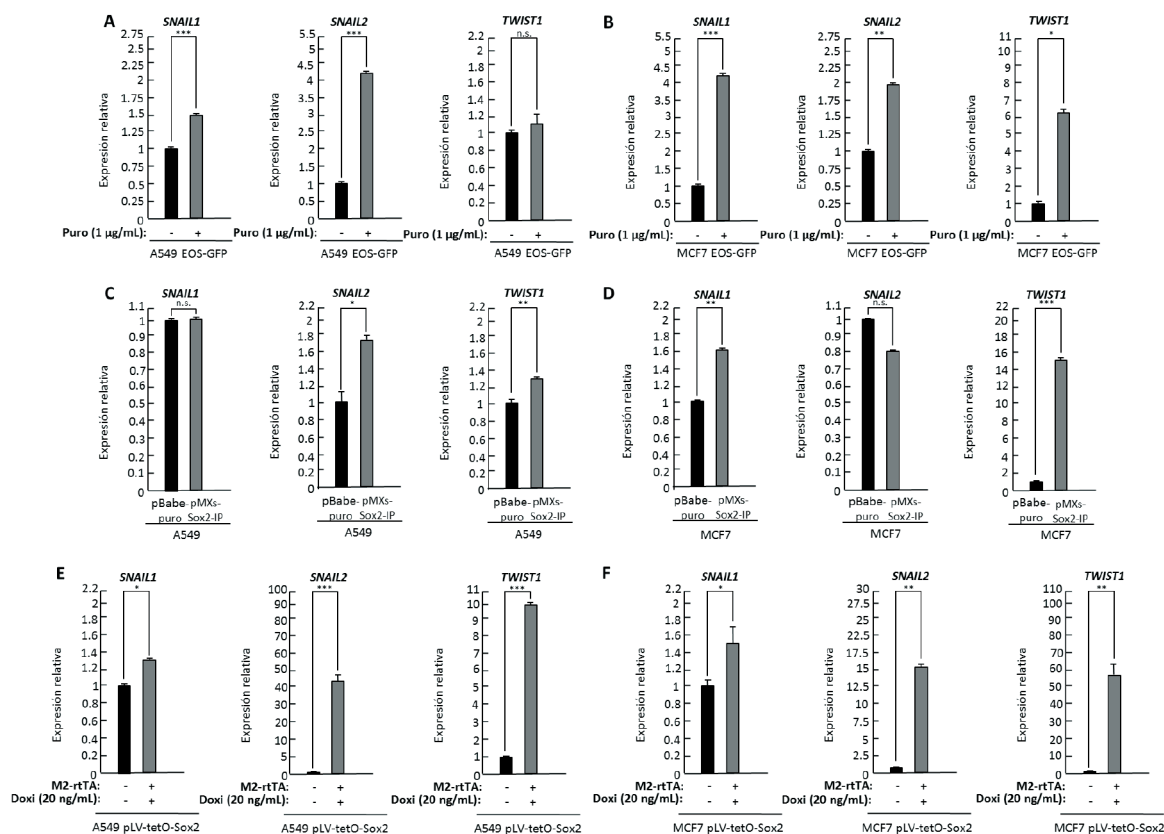


Figura 52. O incremento dos niveis de Sox2 altera os niveis de mRNA de *SNAIL1*, *SNAIL2* e *TWIST1*. Os niveis de mRNA de *SNAIL1*, *SNAIL2* e *TWIST1* nas células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 µg/mL de puromicina (A e B), con pMXs-Sox2-IP (C e D) e pLV-tetO-Sox2 (E e F) cos seus respectivos controis medíronse mediante unha análise de expresión Taqman. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

En conxunto, estes resultados indican que o incremento dos niveis de Sox2 promove o proceso de EMT nas liñas celulares A549 e MCF7.

2.10. O incremento dos niveis de Sox2 promove a migración celular

Ademais dos cambios na morfoloxía e na expresión de diferentes marcadores de EMT, outra das características que definen ao proceso de EMT é unha maior capacidade migratoria por parte das células que adquiren un fenotipo mesenquimal (Kalluri, R. and Weinberg, R.A., 2009). Polo tanto, o seguinte que nos preguntamos foi se o incremento dos niveis de Sox2 nas células A549 e MCF7 promovería a mi-

RESULTADOS

gración celular. Para avaliar isto, realizamos un ensaio de migración en *Transwell*, onde as células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e os dous vectores de sobreexpresión de Sox2 cos seus respectivos controis migraron durante 24 horas. Transcorridas 24 horas, realizouse unha tinguidura con Giemsa e procedeuse á cuantificación celular tal e como explicamos no apartado 12. *Ensaio de migración celular* e 15. *Tinguidura con Giemsa* de Material e Métodos. Como podemos observar na **Figura 54**, as células A549 con niveis de Sox2 incrementados tenden a migrar máis, aínda que esta maior capacidade de migración celular só é estatisticamente significativa no caso das A549 transducidas co vector pMXs-Sox2-IP (**Figura 53C**). Por outro lado, o incremento dos niveis de Sox2 nas células tumorais MCF7 resultou nunha significativa maior migración celular destas células con respecto aos controis (**Figura 53B-D-F**). Polo tanto, estes resultados mostran que niveis aumentados de Sox2 promove a migración celular en A549 e MCF7.

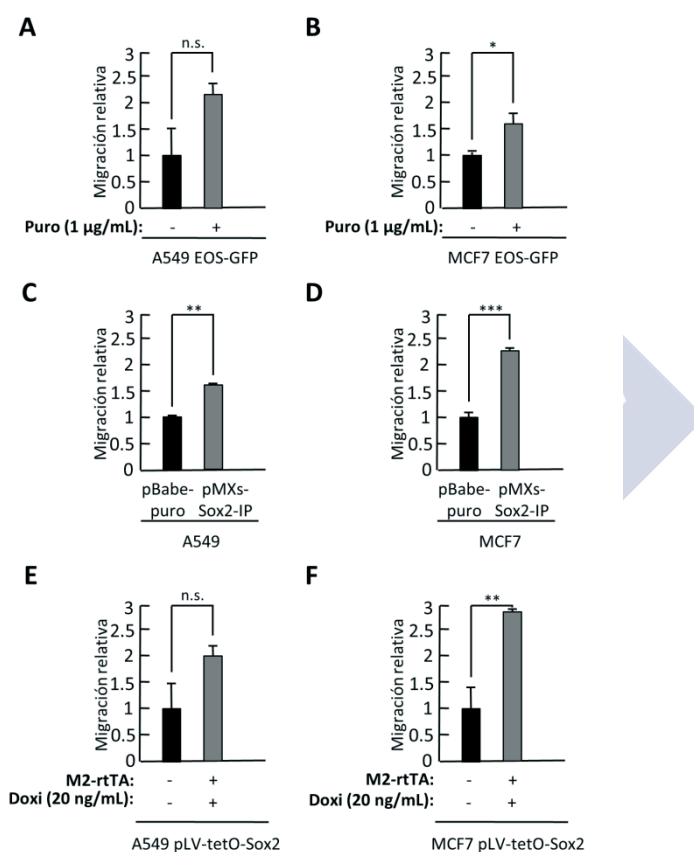


Figura 53. O incremento dos niveis de Sox2 promove a migración celular. A capacidade de migración celular avalíouse mediante a realización dun ensaio de migración en *Transwell*. As gráficas mostran a migración relativa das células A549 e MCF7 transducidas con EOS-GFP e posteriormente seleccionadas con 1 µg/mL de puromicina (A e B), con pMXs-Sox2-IP (C e D) e pLV-tetO-Sox2 (E e F) con respecto aos seus controis tras migrar durante 24 horas. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

3. PAPEL DAS CÉLULAS NAI E PROXENITORAS ADULTAS SOX2 POSITIVAS EN AVELLEMENTAMENTO

Tal e como mencionamos na introdución, o esgotamento de células nai é considerado unha das nove características que contribúen ao proceso de avellentamento e que determinan o fenotipo de avellentamento en diferentes organismos (López-Otín, C. et al., 2013). Tendo en conta isto, e que Sox2 marca poboacións de células nai e proxenitoras en varios tecidos adultos (Arnold, K. et al., 2011), decidimos investigar o papel das células nai e proxenitoras Sox2 positivas no proceso de avellentamento.

3.1. A eliminación de células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas durante 54 semanas pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro

Para estudar o papel das células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas de diferentes tecidos no proceso de avellentamento, empregamos o modelo animal transxénico KI Sox2-TK que alberga o xene da *Timidina Kinasa* truncada (deltaTK) do HSV-1 no locus endógeno de Sox2 (Arnold, K. et al., 2011). Como xa comentamos anteriormente, a administración de GCV a estes ratos transxénicos provoca a morte celular das células Sox2 positivas. Co obxectivo de eliminar as células Sox2 positivas destes ratos de maneira reiterada administramos intraperitonealmente o tratamento de GCV (100 mg/kg) ou HBSS, como control, cada dúas semanas durante 54 semanas até o seu sacrificio dúas semanas despois da última administración (**Figura 54A**). Moitos dos animais Sox2^{TK} tratados con GCV empregados neste procedemento experimental morreron ao longo do tratamento, quedándonos finalmente cun tamaño da mostra (n) escaso, sendo n=5 para os ratos Sox2^{TK} HBSS e n=2 para os ratos Sox2^{TK} GCV. A pesar desta situación, fomos quen de extraer unha serie de datos e resultados experimentais preliminares. O primeiro que observamos foi que os ratos Sox2^{TK} GCV presentan un tamaño corporal reducido (**Figura 54B**) e en consecuencia unha menor masa corporal (**Figura 54C**) con respecto aos ratos Sox2^{WT} HBSS tras a finalización do tratamento. A aparencia externa dos ratos Sox2^{TK} GCV pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro que se caracteriza esencialmente pola presenza de cifose severa (curvatura da columna vertebral na rexión dorsal), a aparición de canas (**Figura 54B**) e por ter unha menor capacidade de rexeneración do pelo (dato non mostrado). Consistente co aspecto externo destes animais a realización dunha análise cuantitativa da composición corporal mostrou que os ratos Sox2^{TK} GCV presentan unha menor porcentaxe de masa graxa corporal que os ratos control (**Figura 54D**), sendo isto un signo indicativo do proceso de avellentamento (Kalu, D. N., 1995).

RESULTADOS

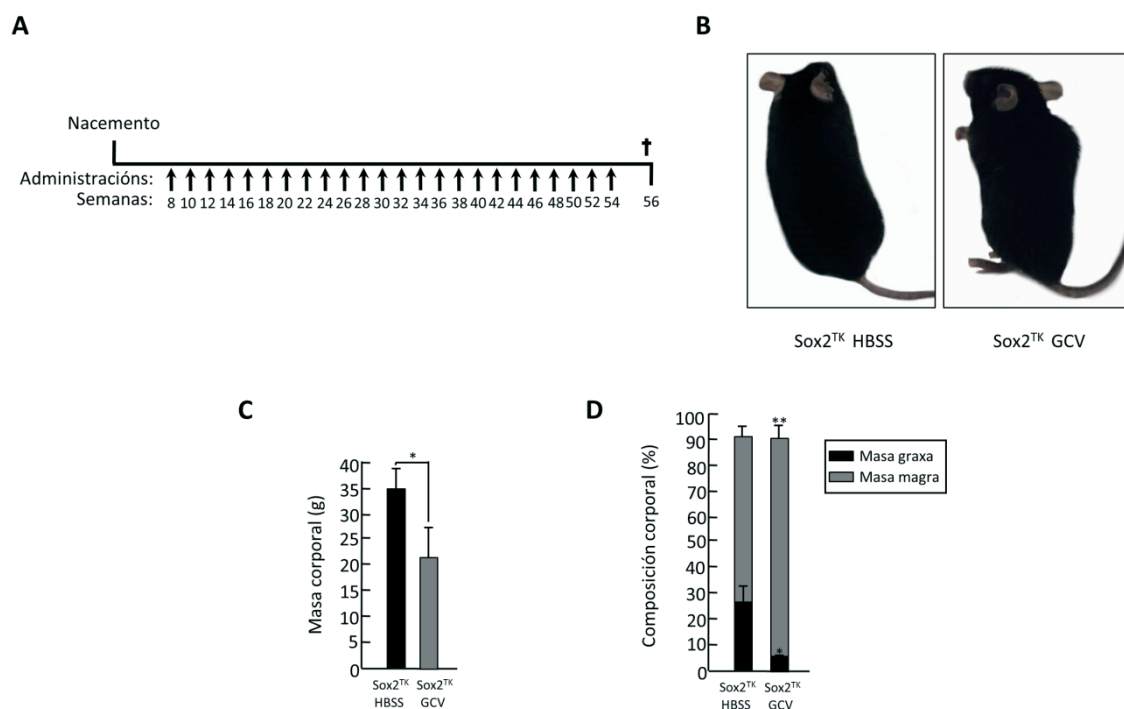


Figura 54. Fenotipo de avellentamento prematuro tras a eliminación de células nai e progenitoras adultas Sox2 positivas durante 54 semanas. A, representación esquemática do protocolo experimental co tratamento GCV (100 mg/kg) e HBSS (control), nos ratos Sox2^{TK}. As inxeccións intraperitoneais administráronse nos tempos indicados (semanas) e os ratos sacrificáronse ás 56 semanas. B, imaxes representativas do fenotipo de avellentamento prematuro que presentan os ratos Sox2^{TK} GCV (dereita) en comparación cos ratos Sox2^{TK} HBSS (esquerda) ás 54 semanas. C, gráfica da masa corporal (g) dos ratos Sox2^{TK} HBSS (n=5) e Sox2^{TK} GCV (n=2) ás 54 semanas. D, gráfica representativa da composición corporal (porcentaxe masa graxa e magra) dos ratos Sox2^{TK} HBSS (n=5) e Sox2^{TK} GCV (n=2) ás 54 semanas. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** *p* < 0.001; ** *p* < 0.01; * *p* < 0.05; n.s. non significativo.

Ás dúas semanas da última administración de GCV ou HBSS os animais son sacrificados e os tecidos extraídos para unha posterior análise molecular e histolóxica. Tendo en conta que as células senescentes se acumulan en varios tecidos e órganos coa idade (Dimri, G.P. et al., 1995), quixemos investigar se os ratos Sox2^{TK} GCV que manifestan un fenotipo de avellentamento prematuro presentan un maior número de células senescentes que os ratos control. Para comprobalo, analizamos a actividade β-galactosidasa asociada a senescencia realizando dous tipos de ensaios. En primeiro lugar, realizamos a tinguidura β-galactosidasa asociada a senescencia empregando un substrato cromoxénico denominado X-Gal e por outra parte detectamos a actividade β-galactosidasa asociada a senescencia mediante un método quimioluminiscente que utiliza o galactón como substrato da β-galactosidasa. En ambos casos, observamos que o ril dos ratos Sox2^{TK} GCV presenta un maior número de células positivas para a tinguidura β-galactosidasa (**Figura 55A-B**) e unha maior actividade da encima β-galactosidasa (**Figura 55C**), en

definitiva, un maior número de células en estado senescente, que os ratos Sox2^{TK} HBSS. En relación ao anteriormente citado, tamén quixemos investigar se o ril dos ratos Sox2^{TK} GCV expresan niveis incrementados de inhibidores do ciclo celular como p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p21^{Cip1} e p53 e de compoñentes do fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) como citoquinas, quimioquinas, factores de crecemento, metaloproteasas da matriz, proteasas e os seus inhibidores, todos eles considerados marcadores do proceso de senescencia celular (Coppé, J.-P. et al., 2010; Kuilman, T. et al., 2010; van Deursen, J.M., 2014). Efectivamente, cando medimos mediante qRT-PCR a expresión de mRNA dalgúns destes marcadores de senescencia no ril, observamos que os ratos Sox2^{TK} GCV presentan un aumento significativo na expresión de dous inhibidores do ciclo celular (*Ink4a* e *Ink4b*) e dalgúns compoñentes do SASP, como a interleuquina *Il6*, a quimioquina *Cxcl1*, a metaloproteasa da matriz *Mmp1*, o inhibidor de proteasas de serina *Serpine1* e un inhibidor de metaloproteasas de matriz denominado *Timp1*, con respecto aos ratos control (**Figura 55D**). Por último, tras a observación de que os testículos dos animais Sox2^{TK} GCV teñen un tamaño inferior aos dos ratos control (dato non mostrado), decidimos realizar unha análise histolóxica destes que mostrou un aumento no número de túbulos atróficos completamente desprovistos de espermatogonias e espermatozoides maduros (**Figura 55E**).



RESULTADOS

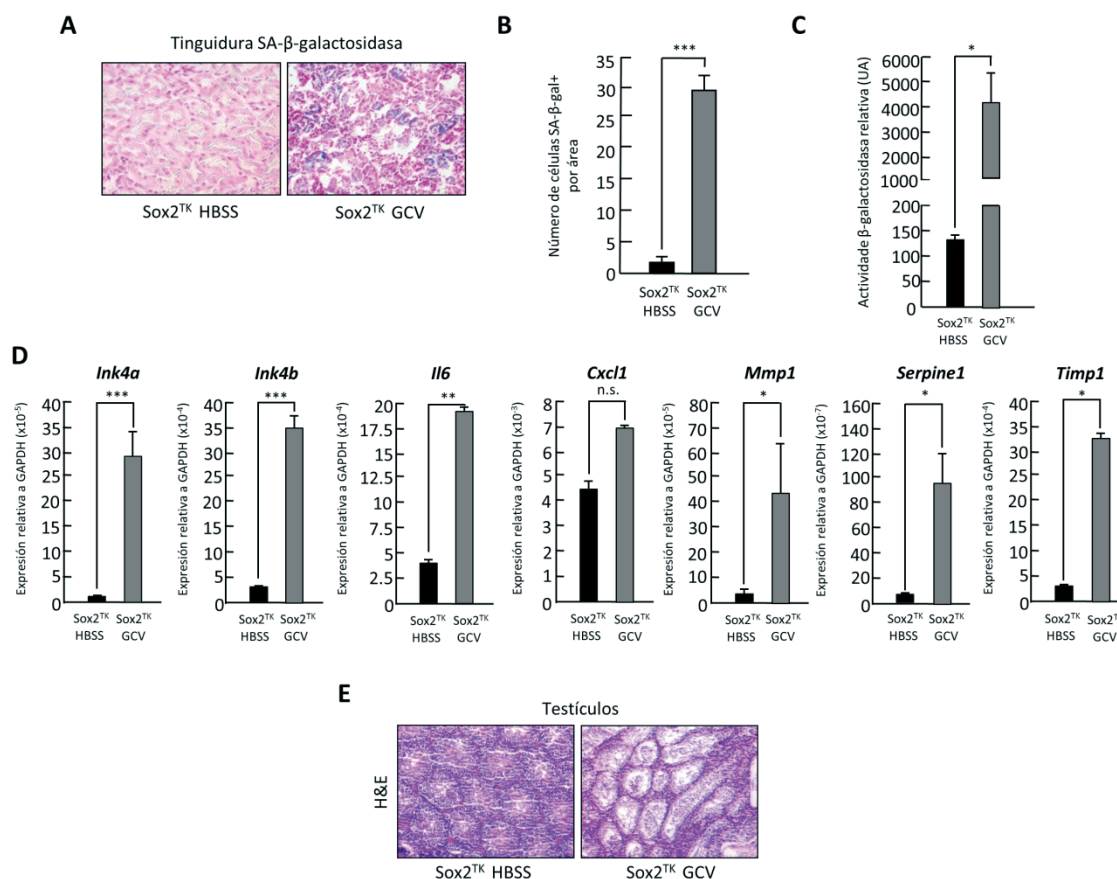


Figura 55. Fenotipo de avellentamento prematuro tras a eliminación de células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas durante 54 semanas. A, imaxes representativas a 20X da tinguidura β-galactosidasa asociada a senescencia en seccións de OCT do ril de ratos Sox2^{TK} HBSS (esquerda) e Sox2^{TK} GCV (dereita). B, cuantificación das células positivas para a tinguidura β-galactosidasa asociada a senescencia en seccións de OCT do ril de ratos Sox2^{TK} HBSS (n=5) e Sox2^{TK} GCV (n=2). C, gráfica da actividade β-galactosidasa asociada a senescencia no ril de ratos Sox2^{TK} HBSS (n=5) e Sox2^{TK} GCV (n=2). Os valores da actividade β-galactosidasa expresados en Unidades Arbitrarias (UA) son relativos con respecto aos mg de tecido. D, análise da expresión de mRNA de diferentes marcadores de senescencia (*Ink4a*, *Ink4b*, *Il6*, *Cxcl1*, *Mmp1*, *Serpine1* e *Timp1*) mediante qRT-PCR no ril de ratos Sox2^{TK} HBSS (n=5) e Sox2^{TK} GCV (n=2). E, imaxe representativas a 20X de seccións de parafina dos testículos de ratos Sox2^{TK} HBSS (esquerda) e Sox2^{TK} GCV (dereita) tinguidas con H&E. A significación estatística analizouse mediante o test t de Student de dúas colas: *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05; n.s. non significativo.

En conxunto, a pesar de partir dun escaso tamaño de mostraxe debido a que algúns dos ratos Sox2^{TK} tratados con GCV empregados neste procedemento experimental morreron durante o tratamento, esta serie de datos preliminares aportounos certa información en canto ao que estaba a acontecer cando eliminabamos as células nai e proxenitoras Sox2 positivas dos tecidos dun rato adulto. Por outra parte, é de gran importancia sinalar que ao longo da realización deste experimen-

to observamos que algúns dos ratos que morrían e levaban tan só a metade de administracións de GCV xa manifestaban un fenotipo de avellentamento prematuro, polo que decidimos realizar unha segunda remesa experimental cun dobre obxectivo, por unha parte, tentar minimizar o número de tratamentos até a metade aproximadamente reducindo así o tempo experimental, xa que parecía que coa metade de administracións xa víamos un efecto fenotípico aparente, e por outra parte incrementar o tamaño da mostra (n) para así verificar os resultados obtidos anteriormente.

3.2. A eliminación das células nai e proxenitoras adultas Sox2 positivas durante 34 semanas xa pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro

Como xa comentamos anteriormente, co obxectivo de minimizar o número de tratamentos e incrementar o tamaño da mostra para corroborar os resultados preliminares previamente obtidos, decidimos repetir o experimento antes descrito con algunhas modificacións. Por un lado, ademais de empregar o modelo animal transxénico Sox2^{TK}, utilizamos o xenotipo WT, denominado Sox2^{WT}, como control, prescindindo así do tratamento con HBSS, e por outra, decidimos deter o tratamento con GCV ás 34 semanas de vida do animal. Polo tanto, neste caso, administramos intraperitonealmente o tratamento de GCV (100 mg/kg) tanto aos ratos Sox2^{TK} como Sox2^{WT} cada dúas semanas durante 34 semanas até o seu sacrificio, dúas semanas despois da última administración (**Figura 56**).

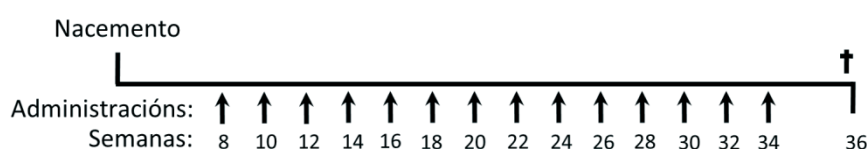


Figura 56. Representación esquemática do protocolo experimental co tratamento GCV (100 mg/kg) nos ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT}. As inxeccións intraperitoneais administráronse nos tempos indicados (semanas) e os ratos sacrificáronse ás 36 semanas.

3.2.1. Os ratos Sox2^{TK} presentan unha menor ganancia de masa corporal

Baseándonos no resultado obtido previamente que indicaba que os ratos Sox2^{TK} GCV tiñan unha menor masa corporal que os Sox2^{TK} HBSS (**Figura 54C**), propúxémonos comparar a ganancia de masa corporal entre ratos Sox2^{TK} e Sox2^{WT} segundo o sexo ao longo do tratamento con GCV. Para iso rexistramos dixitalmente a masa corporal de machos e femias de cada un dos xenotipos cada dúas semanas dende o inicio até a finalización do tratamento. Como podemos observar tanto os machos (**Figura 57A**) como as femias (**Figura 57B**) Sox2^{WT} presentan unha maior

RESULTADOS

ganancia de masa corporal estatisticamente significativa a medida que avanzan na idade respecto aos ratos Sox2^{TK}.

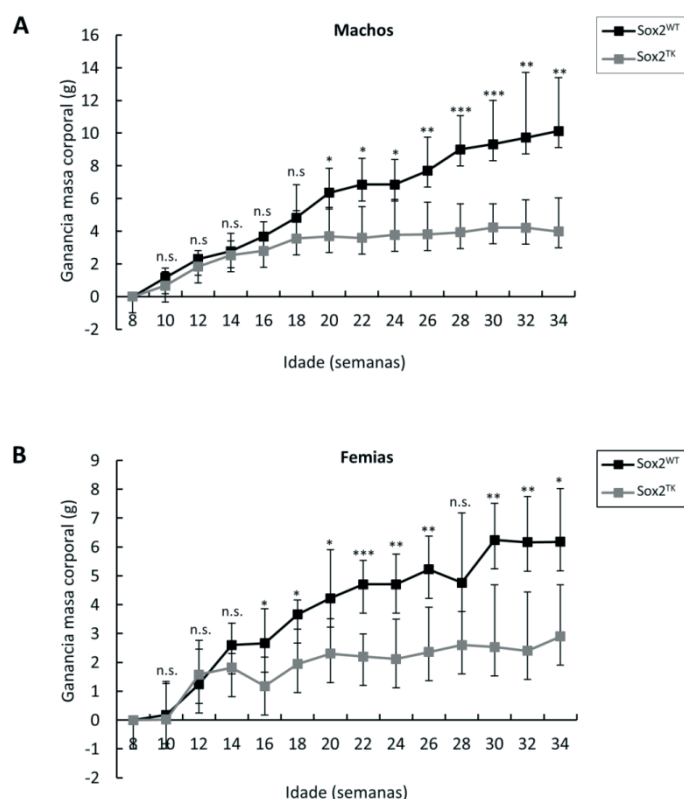


Figura 57. Os ratos Sox2^{TK} presentan unha menor ganancia de masa corporal que os Sox2^{WT}. **A**, curvas da ganancia de masa corporal (g) dos machos Sox2^{TK} (n=9; liña gris) con respecto aos Sox2^{WT} (n=4; liña negra) tratados con GCV coa idade. **B**, curvas da ganancia de masa corporal (g) das femias Sox2^{TK} (n=7; liña gris) con respecto ás Sox2^{WT} (n=4; liña negra) tratadas con GCV coa idade. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

3.2.2. A aparencia externa dos ratos Sox2^{TK} pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro

Unha vez finalizado o tratamento con GCV ás 34 semanas, observamos que tanto os machos como as femias Sox2^{TK} xa presentan un fenotipo de avellentamento prematuro en comparación cos ratos Sox2^{WT} (**Figura 58A**). Este fenotipo caracterízase fundamentalmente polo seu tamaño corporal reducido, un aspecto xeral desmellorado, a presenza de canas (**Figura 58A**) e un maior grao da curvatura fisiolóxica da columna vertebral na rexión dorsal denominada cifose (**Figura 58B**). De feito, a porcentaxe de animais Sox2^{TK} que presentan cifose severa (**Figura 58C**) e canas (**Figura 58D**) é estatisticamente significativa con respecto aos ratos Sox2^{WT}.

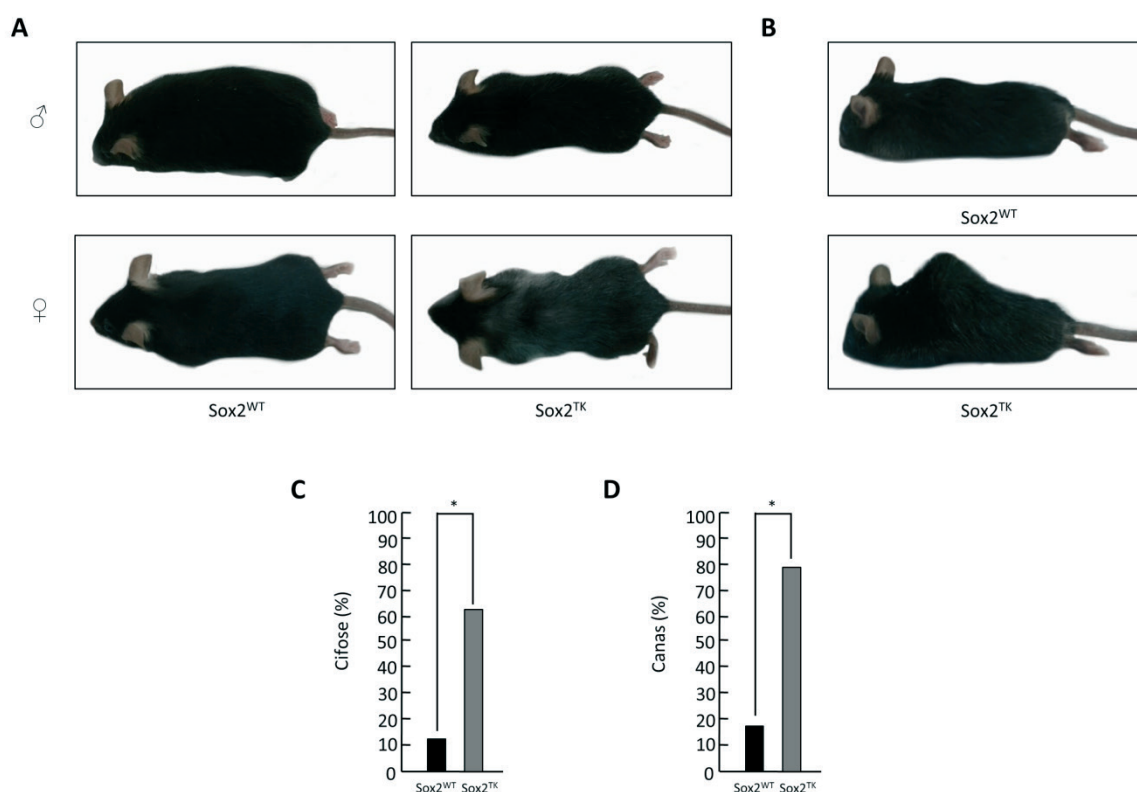


Figura 58. A aparencia externa dos ratos Sox2^{TK} pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro. A, imaxes representativas do fenotipo de avellentamento prematuro que presentan os machos (panel superior) e femias (panel inferior) Sox2^{TK} (dereita) en comparación cos ratos Sox2^{WT} (esquerda) tratados con GCV ás 34 semanas. B, imaxes representativas do grao de cifose dos ratos Sox2^{TK} (panel inferior) en comparación cos ratos Sox2^{WT} (panel superior) tratados con GCV ás 34 semanas. C, gráfica da porcentaxe de animais Sox2^{TK} (n=16) que manifestan cifose con respecto aos ratos Sox2^{WT} (n=8) tratados con GCV ás 34 semanas. D, gráfica da porcentaxe de animais Sox2^{TK} (n=16) que presentan canas con respecto aos ratos Sox2^{WT} (n=8) tratados con GCV ás 34 semanas. A significación estatística analizouse mediante o test exacto de Fisher: *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05; n.s. non significativo.

3.2.3. Os ratos Sox2^{TK} teñen menor capacidade de rexeneración de pelo pero non de coordinación neuromuscular

O fenotipo de avellentamento prematuro que manifestan os ratos Sox2^{TK} tratados con GCV en comparación cos ratos control, levounos a realizar dous ensaios funcionais considerados biomarcadores do proceso de avellentamento. Tendo en conta que a diminución da rexeneración do pelo é outro sinal de avellentamento prematuro (Kondratov, R. V et al., 2006; Li, L. et al., 2013; Tyner, S.D. et al., 2002), decidimos realizar un ensaio de recrecemento de pelo para investigar a influencia do avellentamento sobre o tecido da pel. Desta maneira, ás 34 semanas, un segmento de pel de 1.5 cm x 1.5 cm foi eliminado mediante depilación da rexión dorsal

RESULTADOS

dos ratos até a súa avaliación aos 15 días. Como podemos observar nas imaxes da **Figura 59A**, os ratos Sox2^{TK} teñen unha menor capacidade de rexeneración de pelo con respecto aos ratos control. Como mencionamos no apartado 23. *Ensaio de recrecemento de pelo* de Materiais e Métodos a partir destas fotografías dixitais, realizamos unha avaliación semicuantitativa empregando unha escala arbitraria do 1 ao 3 (sendo o 3 a rexeneración completa do pelo) que nos permitiu concluír que esa menor capacidade no recrecemento do pelo que presentaban os ratos Sox2^{TK} era estatisticamente significativa (**Figura 59B**). Así mesmo, outros dos biomarcadores de avellentamento que analizamos foi a perda progresiva de coordinación neuromuscular coa idade (Ingram, D.K. and Reynolds, M.A., 1986) mediante a realización dun ensaio de coordinación neuromuscular, denominado *tightrope test*. Curiosamente, non se observaron diferenzas significativas entre os ratos Sox2^{TK} e os animais control (datos non mostrados).

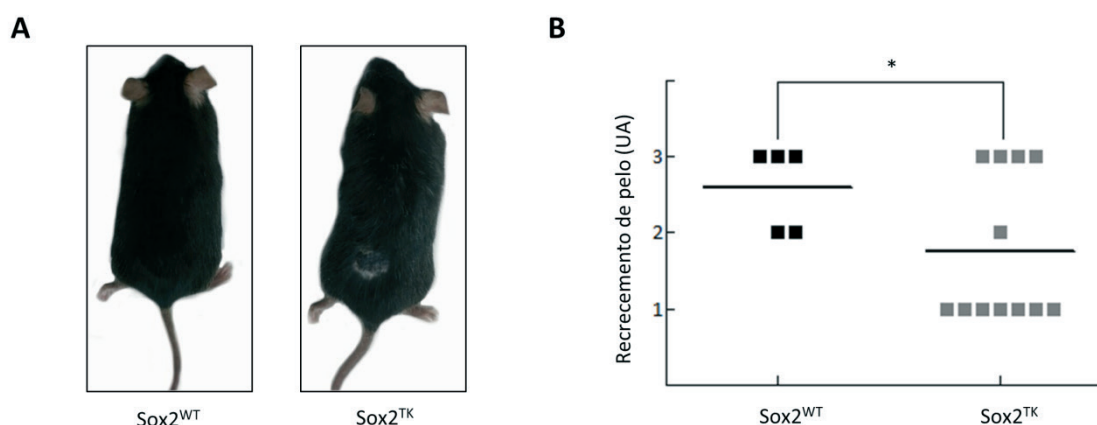


Figura 59. Os ratos Sox2^{TK} teñen menor capacidade de rexeneración de pelo que os Sox2^{WT}. **A**, imaxes representativas da capacidade de rexeneración de pelo dos ratos Sox2^{WT} (esquerda) en comparación cos ratos Sox2^{TK} (dereita) tratados con GCV aos 15 días da depilación dorsal. **B**, gráfica da capacidade de recrecemento de pelo dos ratos Sox2^{WT} (n=5) en comparación cos ratos Sox2^{TK} (n=12) tratados con GCV. O recrecemento de pelo foi avaliado 15 días despois da depilación dorsal como explicamos no apartado 23. *Ensaio de recrecemento de pelo* de Material e métodos. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

3.2.4. Os machos Sox2^{TK}, pero non as femias, teñen menor porcentaxe de masa graxa corporal

Dado que o avellentamento tamén está asociado ca perda de masa graxa corporal coa idade (Kalu, D. N., 1995), decidimos realizar unha análise cuantitativa da composición corporal dos machos e femias de ambos xenotipos. Como podemos observar na **Figura 60A**, os machos Sox2^{TK} tratados con GCV presentan unha porcentaxe menor de masa graxa corporal estatisticamente significativa en comparación cos ratos control. Curiosamente, pola contra, as femias Sox2^{TK} e Sox2^{WT}

tratadas con GCV non presentan diferenzas significativas en canto á porcentaxe de masa graxa corporal (**Figura 60B**).

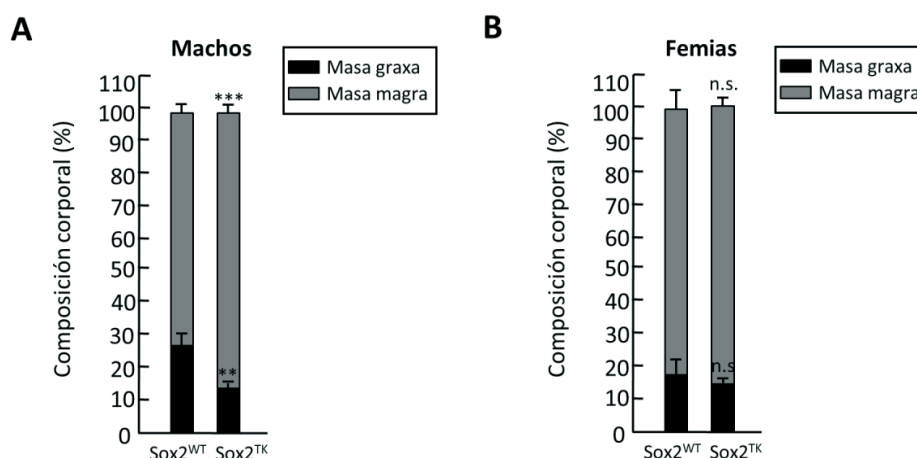


Figura 60. Os machos Sox2^{TK}, pero non as femias, teñen menor porcentaxe de masa graxa corporal que os ratos Sox2^{WT}. **A**, gráfica representativa da composición corporal (porcentaxe masa graxa e magra) dos machos Sox2^{TK} (n=9) e Sox2^{WT} (n=4) tratados con GCV ás 34 semanas. **B**, gráfica representativa da composición corporal (porcentaxe masa graxa e magra) das femias Sox2^{TK} (n=7) e Sox2^{WT} (n=4) tratadas con GCV ás 34 semanas.

3.2.5. Os ratos Sox2^{TK} presentan unha maior actividade β -galactosidasa asociada a senescencia no ril

Diferentes estudos mostraron que coa idade, as células senescentes acumúlanse en varios tecidos e órganos do noso organismo, chegando a xogar, a senescencia celular, un papel clave no proceso de avellentamento (Dimri, G.P. et al., 1995). Co obxectivo de investigar se os ratos Sox2^{TK} tratados con GCV presentan un maior número de células senescentes nalgún dos seus tecidos que os ratos control, analizamos a actividade β -galactosidasa asociada a senescencia, un biomarcador que permite identificar células senescentes *in vitro* e *in vivo*. Para comprobar isto, realizamos dous tipos de ensaios, a tinguidura β -galactosidasa asociada a senescencia que emprega ao X-Gal como substrato cromoxénico e a detección da actividade β -galactosidasa asociada a senescencia mediante un método quimio-luminiscente que utiliza como substrato da encima o galactón. Como podemos observar na **Figura 61A-B**, o ril dos ratos Sox2^{TK} teñen un maior número de células positivas para a tinguidura β -galactosidasa que os ratos control, ao igual que presentan unha maior actividade da encima β -galactosidasa (**Figura 61C**).

RESULTADOS

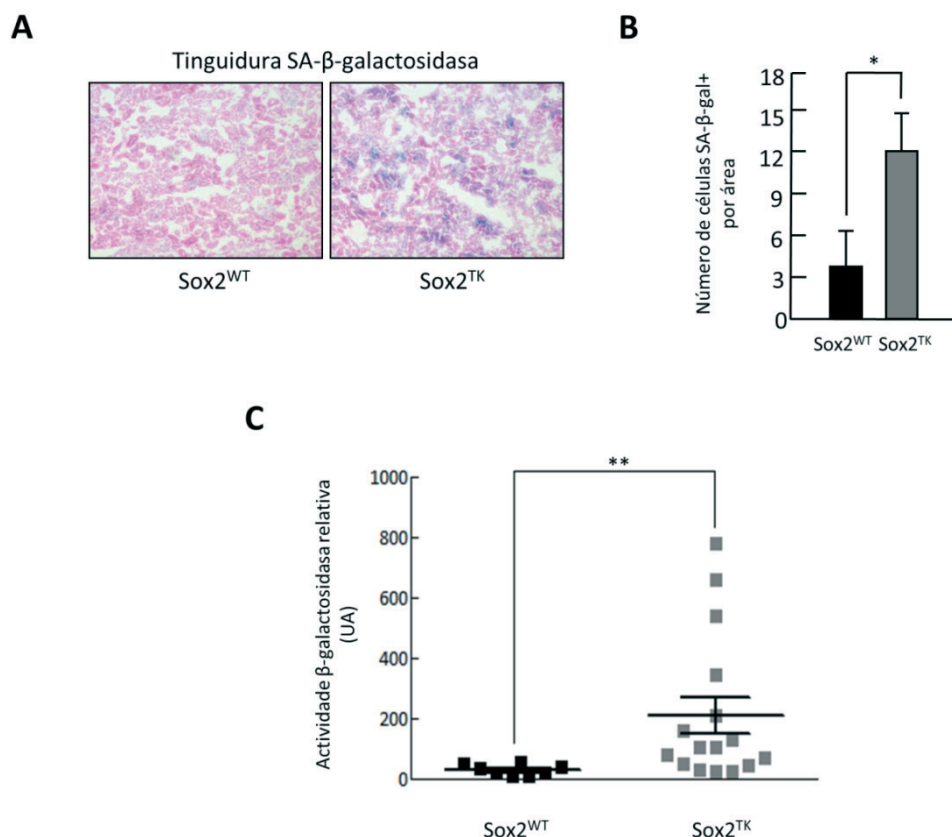


Figura 61. Os ratos Sox2^{TK} presentan unha maior actividade β-galactosidasa asociada a senescencia no ril que os ratos Sox2^{WT}. **A**, imaxes representativas a 20X da tinguidura β-galactosidasa asociada a senescencia en seccións de OCT do ril de ratos Sox2^{WT} (esquerda) e Sox2^{TK} (dereita). **B**, cuantificación das células positivas para a tinguidura β-galactosidasa asociada a senescencia en seccións de OCT do ril de ratos Sox2^{WT} (n=8) e Sox2^{TK} (n=16) tratados con GCV. **C**, gráfica da actividade β-galactosidasa asociada a senescencia no ril de ratos Sox2^{WT} (n=8) e Sox2^{TK} (n=16) tratados con GCV. Os valores da actividade β-galactosidasa expresados en Unidades Arbitrarias (UA) son relativos con respecto aos mg de tecido. A significación estatística analizouse mediante o test t de Student de dúas colas: *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05; n.s. non significativo.

3.2.6. Os ratos Sox2^{TK} tenden a expresar maiores niveis de inhibidores do ciclo celular e de compoñentes do SASP no ril

Ademais da actividade β-galactosidasa asociada a senescencia, o incremento na expresión de inhibidores do ciclo celular como p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p21^{Cip1} e p53 e de compoñentes do SASP como citoquinas, quimioquinas, factores de crecemento, metaloproteasas da matriz, proteasas e os seus inhibidores, etc., tamén é considerado un marcador que se emprega regularmente para a identificación de células senescentes (Coppé, J.-P. et al., 2010; Kuilman, T. et al., 2010; van Deursen, J.M., 2014). Para medir a expresión de mRNA dalgúns destes marcadores de senescencia celular, realizamos unha qRT-PCR, onde detectamos, en efecto, unha tendencia de aumento na expresión tanto de inhibidores do ciclo celular como compoñentes

do SASP no ril dos ratos Sox2^{TK} con respecto aos ratos control (Figura 62). A pesar desta tendencia, este incremento na expresión só é estatisticamente significativo para dous compoñentes do SASP, para a metaloproteasa de matriz, *Mmp3* e para o inhibidor de proteasas de serina, *Serpine1* (Figura 62).

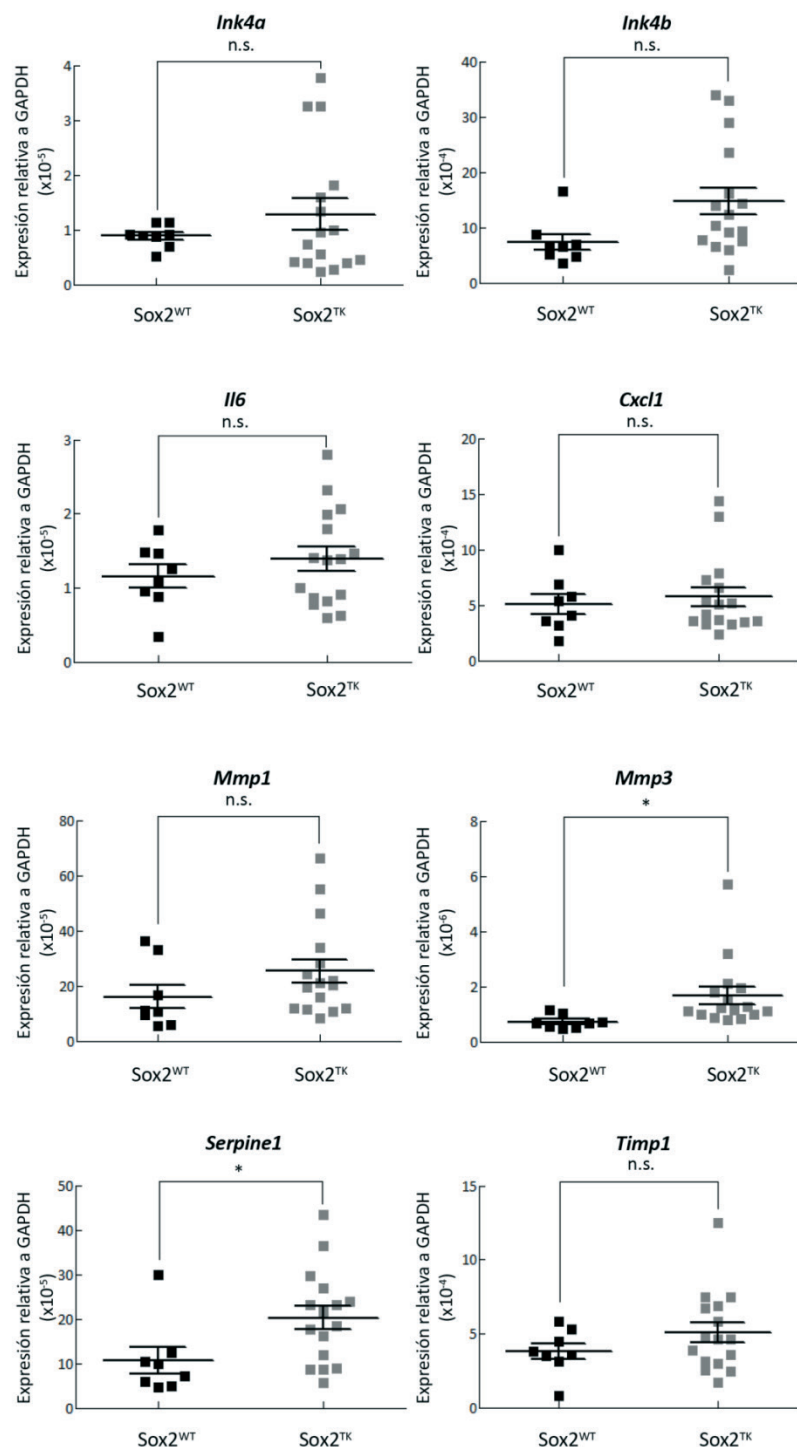


Figura 62. Os ratos Sox2^{TK} tenden a expresar maiores niveis de inhibidores do ciclo celular e de compoñentes SASP no ril que os ratos Sox2^{WT}. Análise da expresión de mRNA de diferentes marcadores de senescencia (*Ink4a*, *Ink4b*, *Il6*, *Cxcl1*,

RESULTADOS

Mmp1, *Mmp3*, *Serpine1* e *Timp1*) mediante qRT-PCR no ril de ratos Sox2^{WT} (n=8) e Sox2^{TK} (n=16) tratados con GCV. A significación estatística analizouse mediante o test t de Student de dúas colas: *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05; n.s. non significativo.

3.2.7. Algúns órganos dos ratos Sox2^{TK} presentan alteracións na súa homeostase tisular

Tras o sacrificio dos animais Sox2^{WT} e Sox2^{TK} tratados con GCV ás 36 semanas, observamos de maneira visual que algúns órganos, entre eles, os testículos (**Figura 63A**) e os pulmóns (**Figura 63B**) dos animais Sox2^{TK} presentan un tamaño inferior aos dos ratos control.

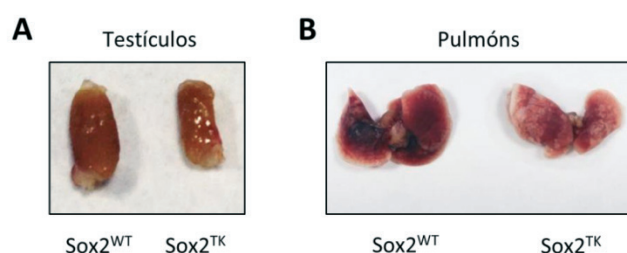


Figura 63. Imaxe representativa do tamaño dos testículos (A) e pulmóns (B) de ratos Sox2^{WT} e Sox2^{TK} tratados con GCV.

Dado o tamaño reducido dos testículos nos ratos Sox2^{TK} tratados con GCV, decidimos realizar unha análise histolóxica mediante unha tinguidura H&E que mostrou un aumento no número de túbulos atróficos completamente desprovistos de espermatogonias e espermatozoides maduros (**Figura 64A**). Este feito parece demostrar que as células Sox2 positivas do testículo son esenciais para a espermatoxénese, sendo a diminución desta outro signo evidente de avellentamento (Gosden, R.G. et al., 1982; Suzuki, N. and Withers, H.R., 1978).

En relación coa observación anterior, decidimos comprobar se a eliminación das células Sox2 positivas nos ratos Sox2^{TK} tratados con GCV tamén tiña algún outro efecto noutros órganos. Para pescudar iso, realizamos unha tinguidura H&E do estómago (**Figura 64A**), e o primeiro que observamos foi que os ratos Sox2^{TK} presentaban unha clara redución no número de células da capa basal do estómago con respecto aos ratos control (**Figura 64B**), que coincide coa perda de expresión de Sox2 tal e como mostra a inmunohistoquímica para Sox2 no estómago (**Figura 64A**). Ademais, no caso dos ratos Sox2^{TK} algunhas capas estratificadas do estómago perdéronse e en consecuencia a capa epitelial do estómago mostrou un adelgazamento notable en comparación cos ratos Sox2^{WT} (**Figura 64A**). Este resultado demostra que as células Sox2 positivas son fundamentais para o mantemento da homeostase tisular, a cal se perde a medida que avanza a idade (Kirkwood, T.B.L., 2005; Rando, T.A., 2006).

Finalmente, para tentar entender a diversidade fenotípica de avellentamento

premature que nos atopamos nos ratos Sox2^{TK} tratados con GCV, decidimos analizar o grao de eliminación de células Sox2 positivas tras o tratamento. Para verificar isto, realizamos unha inmunohistoquímica para Sox2 en seccións procedentes do estómago e traquea, ambos tecidos coñecidos por expresar Sox2. Como podemos observar nas imaxes (**Figura 64A**), os ratos Sox2^{TK} presentan un menor número de células positivas para Sox2 (**Figura 64C**) e unha menor intensidade da tinguidura con respecto aos ratos Sox2^{WT}. Non obstante, é de importancia sinalar que o grao de eliminación de células Sox2 positivas nos ratos Sox2^{TK} tratados é moi variable entre individuos, o que podería explicar a diversidade fenotípica que nos atopamos nos nosos resultados experimentais.

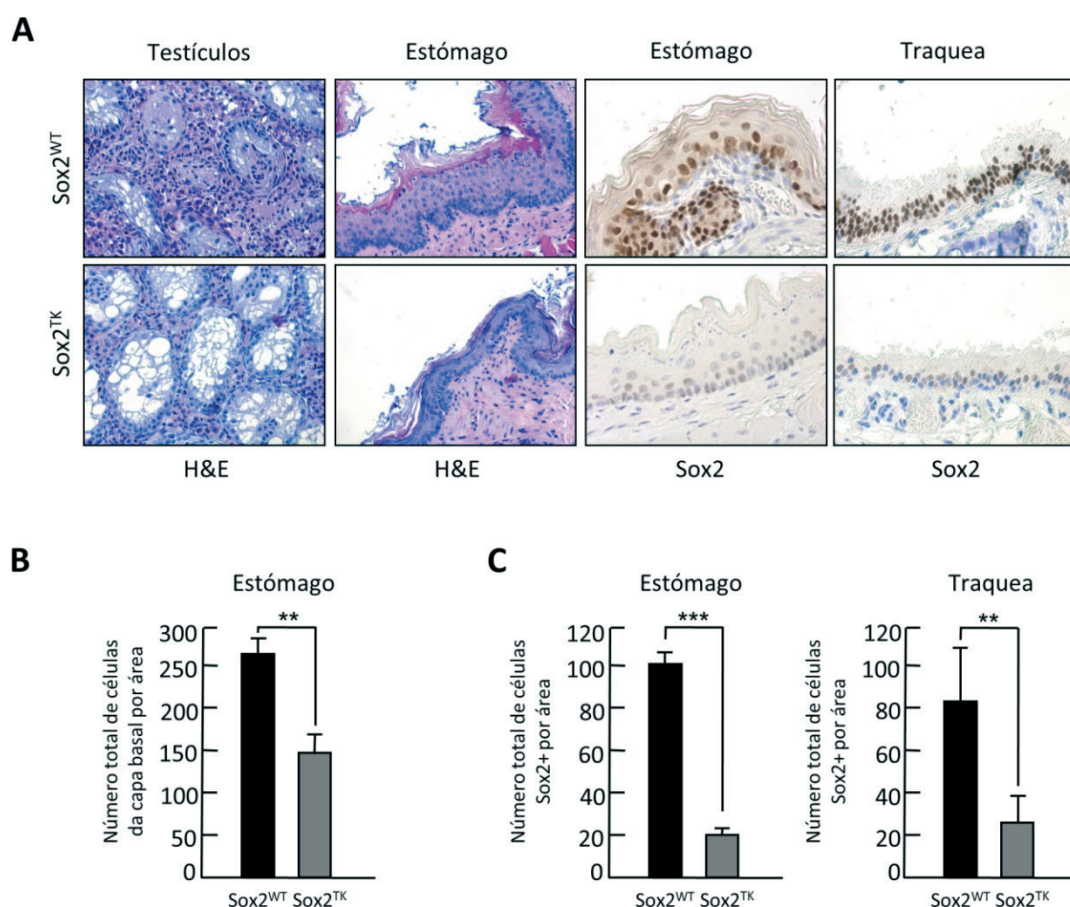


Figura 64. Algúns órganos dos ratos Sox2^{TK} presentan alteracións na súa homeostase tisular. **A**, imaxes representativas de seccións de parafina de tecidos de ratos Sox2^{WT} (panel superior) e Sox2^{TK} (panel inferior) tratados con GCV. As dúas primeiras filas de imaxes corresponden a seccións do testículo e estómago tinguidas con H&E (20X) e as dúas últimas a inmunohistoquímicas de seccións do estómago e traquea para Sox2 (40X). **B**, cuantificación de células da capa basal en seccións do estómago de ratos Sox2^{WT} (n=8) e Sox2^{TK} (n=16) tratados con GCV. **C**, cuantificación de células Sox2 positivas en seccións do estómago e traquea de ratos Sox2^{WT} (n=8) e Sox2^{TK} (n=16) tratados con GCV. A significación estatística analizouse mediante o test *t* de Student de dúas colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. non significativo.

DISCUSIÓN



As células nai atópanse en todos os organismos multicelulares e defínense funcionalmente como células que son capaces de autorrenovarse para producir células nai fillas con propiedades idénticas á célula nai orixinal e diferenciarse xerando diversos tipos celulares especializados (Smith, A.G., 2001; Weissman, I.L. et al., 2001). Ao longo destes anos moitos tipos diferentes de células nai foron illadas, identificadas e caracterizadas.

O feito de que as células nai e as células tumorais compartan unha serie de características como a autorrenovación e a plasticidade fenotípica (Reya, T. et al., 2001), que os tumores poidan derivar de células proxenitoras ou células nai non diferenciadas, que as células cancerixenas poidan sufrir unha desdiferenciación progresiva durante o seu desenvolvemento (Beachy, P.A. et al., 2004; Reya, T. et al., 2001; Stingl, J. and Caldas, C., 2007), que algúns autores suxiran que as CSCs poden derivar das células nai (Greenow, K. and Clarke, A.R., 2012; Lobo, N.A. et al., 2007; Reya, T. et al., 2001) e que as ESCs e múltiples tipos de células tumorais humanas compartan patróns de expresión xénica (Ben-Porath, I. et al., 2008; Wong, D.J. et al., 2008), suxeriu que as células nai poden ter un papel no proceso biolóxico do cancro. Por outro lado, as células nai tamén desempeñan unha función importante no inevitable proceso do avellentamento, xa que perdas no número, na funcionalidade ou cambios no destino das células nai adultas provocan unha diminución da capacidade homeostática e rexenerativa dos tecidos e órganos do noso corpo, un dos signos máis obvios do avellentamento (Campisi, J., 2005; Liu, L. and Rando, T.A., 2011; López-Otín, C. et al., 2013; Ortells, M.C. and Keyes, W.M., 2014).

Sox2 é un factor de transcrición que se expresa en diferentes etapas do desenvolvemento embrionario e a súa expresión persiste en certos tecidos adultos. De feito, Sox2 exprésase inicialmente nas ESCs, onde xoga un papel importante no establecemento e mantemento da pluripotencia, a súa expresión mantense en células proxenitoras fetais, dando lugar a liñaxes celulares diversos, e persiste en tecidos adultos derivados de proxenitores fetais Sox2 positivos, onde é relevante na homeostase e rexeneración tisular (Sarkar, A. and Hochedlinger, K., 2013).

Por todo o mencionado anteriormente, neste proxecto nos propuxemos estudar a regulación transcricional e a función de Sox2 en cancro e avellentamento.

1. REGULACIÓN DE SOX2 POR PROTEÍNAS POCKET EN CANCRO

Como comentamos a priori na introdución, un estudo previo levado a cabo por Manuel Serrano e colaboradores (Li, H. et al., 2012) mostrou que a tras a diferenciación das ESCs, o complexo represivo p27-p130-E2F4-SIN3A, do cal o membro da familia das proteínas pocket p130 forma parte, únese ao *enhancer* SRR2 do xene Sox2, o que conduce á represión transcricional de Sox2 en células diferenciadas. Este feito, xunto coas similitudes que hai entre os procesos de reprogramación celular e a transformación oncoxénica (Daley, G.Q., 2008), levounos a querer investigar o papel dos membros da familia das proteínas pocket na represión transcricional de Sox2.

En relación á posible contribución dos membros da familia das proteínas *pocket* na represión de xenes de pluripotencia, a nosa primeira observación foi que os MEFs deficientes para *Rb* ou *p130*, pero non para *p107*, mostran niveis incrementados de *Sox2* debido a unha represión defectuosa da transcrición deste xene. Cabe destacar que estes resultados son consistentes co xa publicado por Manuel Serrano e colaboradores (Li, H. et al., 2012) para o inhibidor do ciclo celular e supresor tumoral *p27* e mesmo para a proteína *pocket* *p130*, onde as células deficientes en *p27* ou *KD* para *p130*, mediante un shRNA, presentaban niveis de expresión de *Sox2* aumentados. Por outro lado, simultaneamente ao noso traballo, Marius Wernig e colaboradores (Kareta, M.S. et al., 2015) identificaron os mecanismos polos cales o supresor tumoral *Rb* suprime a desdiferenciación celular utilizando a reprogramación a iPSCs como sistema celular. En primeiro lugar, eles atoparon que a perda de *Rb* facilita o proceso de reprogramación celular a iPSCs, xa que ausencia deste supresor tumoral incrementa a eficiencia e mellora a cinética de reprogramación. Sorprendentemente, esta mellora na cinética e na eficiencia de reprogramación observada en ausencia de *Rb* non é debido a cambios nos perfís do ciclo celular. De forma contraria, a sobreexpresión de *Rb* reduce a eficiencia deste proceso. Eles tamén demostraron que a falta de *p107* ou *p130*, membros da familia retinoblastoma das proteínas *pocket* xunto con *Rb*, non provoca cambios na súa eficiencia de reprogramación, mentres que a ausencia da familia enteira non permite a reprogramación a iPSCs, seguramente debido a unha resposta ao estrés non identificada que conduce a un aumento da apoptose durante a reprogramación.

De seguido, os autores investigaron como a ausencia do supresor tumoral *Rb* pode facer que os fibroblastos sexan máis susceptibles á reprogramación. Unha das súas primeiras observacións foi que a perda de *Rb* conduce a unha desrepresión global de compoñentes do programa transcricional de pluripotencia, pois atoparon que as células deficientes en *Rb* estaban enriquecidas de maneira significativa na sinatura xénica específica de iPSCs e que ademais presentaban un leve pero significativo incremento da expresión de dous xenes de pluripotencia, *Sox2* e *Oct4*.

O feito de que os membros do complexo represivo *p27-p130-E2F4-SIN3A*, entre eles os supresores tumorais *p27* e *p130*, se unan e ocupen o principal elemento regulador de *Sox2* en células nai pluripotentes, o *enhancer* *SRR2*, tras a diferenciación das ESCs (Li, H. et al., 2012) fixo que buscamos onde se unen os tres membros das proteínas *pocket* en células diferenciadas. A realización de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina mostrou que as tres proteínas *pocket* teñen o potencial de unirse ao *enhancer* *SRR2*. Non obstante, como comentamos anteriormente, a deficiencia de *p107* non conduce a un incremento na expresión de *Sox2*, probablemente como resultado de mecanismos de compensación por outros membros da familia das proteínas *pocket*. De feito, a compensación funcional entre as proteínas *pocket* é unha característica común da familia (Vidal, A. et al., 2007). En consistencia con estes resultados, Marius Wernig e colaboradores (Kareta, M.S. et al., 2015) demostraron que a acción represiva de *Rb* nos xenes de pluripotencia era directa, xa que atoparon que *Rb* se unía directamente a elemen-

tos ou rexións reguladoras dun número de xenes implicados en reprogramación e pluripotencia, como Sox2 e Oct4. Notablemente, no caso do locus Sox2, Rb únese ao *enhancer* SRR2. Ademais, os autores deste traballo de investigación determinaron que a unión de Rb a xenes de pluripotencia xoga un papel no contexto da diferenciación celular, pois observaron que a unión de Rb a elementos reguladores dos factores de pluripotencia Sox2 e Oct4, contribúe ao seu silenciamento en células diferenciadas e restrinxe a súa re-expresión durante o proceso de reprogramación celular. En relación a este último resultado, os seus estudos suxeriron que existe unha interacción directa entre Rb e as proteínas E2Fs nos loci Sox2 e Oct4 que é requirida para o silenciamento ou represión destes xenes de pluripotencia. Ademais, dado que o estudo de Manuel Serrano e colaboradores (Li, H. et al., 2012) mostrou que p27 reprime Sox2, eles determinaron a localización de p27 no DNA en fibroblastos wt, p130 $-/-$, p107 $-/-$ e KO para os 3 membros da familia retinoblastoma. Os seus resultados revelaron que p27 únese ao *enhancer* SRR2, mesmo na ausencia de p130 e p107, pero non nos fibroblastos triplo KO, indicando que o recrutamento de p27 no locus Sox2 pode estar mediado por Rb (Kareta, M.S. et al., 2015).

Tendo en conta que pRb e p130 se unen ao *enhancer* SRR2 e que a ausencia de ambas proteínas *pocket* provoca unha desrepresión de Sox2 en células somáticas, o seguinte que nos preguntamos foi se a ausencia das proteínas *pocket* alteraría as marcas epixenéticas arredor do *enhancer* ao igual que acontece no caso de p27 cando está ausente no complexo represivo p27-p130-E2F4-SIN3A que se une ao *enhancer* SRR2 (Li, H. et al., 2012). Efectivamente, ensaios de inmunoprecipitación de cromatina revelaron que a falta das proteínas *pocket*, Rb e p130, conduce á alteración da paisaxe epixenética no *enhancer* SRR2, xa que os nosos resultados mostran que ausencia de Rb e p130 provoca unha redución da marca de histona represiva H3K27me3 e un aumento da marca activadora H3K4me3. Así mesmo, Marius Wernig e colaboradores (Kareta, M.S. et al., 2015) atoparon que a regulación de xenes diana por Rb correlaciona co recrutamento de complexos modificadores de histonas e a conseguinte regulación das marcas de histonas. A perda de Rb resulta nun incremento significativo das marcas H3Ac e H3K4me3 e a diminución de H3K27me3 en múltiples xenes de pluripotencia, como Oct4, Sox2 e Nanog. Sinaladamente, a rexión coas marcas H3Ac e H3K4me3 incrementadas *downstream* de Sox2 non é o *enhancer* SRR2, senón máis ben unha rexión que está unida tanto por p300 e CTCF e pode interactuar co *enhancer* SRR2. Ademais, demostraron que a ausencia de Rb en fibroblastos xera unha paisaxe de cromatina que se asemella máis a das ESCs, polo que a perda de Rb, non só conduce a unha desrepresión dalgúns dos xenes núcleo de pluripotencia, senón que tamén altera especificamente a cromatina de xenes *downstream* para estes factores de pluripotencia, posiblemente facilitando a transcripción dun programa de pluripotencia global e a súa execución.

Unha das consecuencias funcionais da represión defectuosa de Sox2 en MEFs deficientes para p27, foi que estas células foron capaces de reprogramarse a iPSCs sen necesidade de Sox2 exógeno (Li, H. et al., 2012). A realización de experimentos de reprogramación celular con MEFs deficientes para Rb ou p130 mostrou unha

situación similar, pois obtivemos colonias en ambos casos con só dous factores de reprogramación (Oct4 e Klf4) en ausencia de Sox2 ectópico. Pola contra, os MEFs con falta de *p107* non se reprogramaron e polo tanto non se obtivo ningunha colonia en ausencia de Sox2 exógeno. No caso dos fibroblastos carentes de *Rb*, as colonias iPSCs obtidas con só dous factores foron debidamente caracterizadas. Estas colonias foron positivas para a tinguidura AP e para a sinal GFP procedente do plásmido repoteiro de pluripotencia EOS-GFP. Ademais, estas colonias expresaron diferentes factores de pluripotencia endóxenos como Sox2, Nanog, Oct4 e Klf4 tanto a nivel proteico como de mRNA e foron capaces de diferenciarse *in vitro* a corpos embrionarios, os cales expresaron marcadores de diferenciación das tres capas xerminais. Lamentablemente, a falta de tempo, non nos permitiu realizar a proba de formación de teratomas para testar a capacidade destas iPSCs de diferenciarse *in vivo* nin ver, por último, se estas iPSCs eran capaces de contribuír ao desenvolvemento embrionario mediante a formación de quimeras que sexan capaces de transmitir en liña xerminar. Neste senso, a nivel funcional, Marius Wernig e colaboradores (Kareta, M.S. et al., 2015) tamén observaron que os pequenos niveis de Sox2 que presentaban os fibroblastos deficientes en *Rb* debido a unha desrepresión deste xene de pluripotencia, eran capaces de reprogramar a estes fibroblastos sen necesidade de Sox2 exógeno. Por tanto, a perda de *Rb* pode substituír funcionalmente a Sox2 durante a reprogramación a iPSCs. Neste caso, os clons de iPSCs deficientes en *Rb* reprogramados en ausencia de Sox2 ectópico tamén presentaban unha morfoloxía típica de colonia iPSCs, eran positivas para a tinguidura AP, expresaron os factores de pluripotencia endóxenos Oct4, Sox2 e Nanog, formaron teratomas coas tres capas xerminais e contribuíron ao desenvolvemento do embrión formando ratos quiméricos. Ademais, os autores deste traballo demostraron que *Rb* pode controlar a expresión doutros factores de pluripotencia, como Oct4 e Nanog. Cando *Rb* está ausente, a expresión de Oct4 e Nanog incrementa de maneira significativa, aínda que, a perda de *Rb* non compense ao Oct4 exógeno para xerar iPSCs totalmente reprogramadas. Este resultado coincide co observado no noso traballo de investigación, onde mostramos que as células carentes de *Rb* presentan niveis incrementados de *Nanog*.

A implicación de Sox2 en cancro é altamente coñecida, xa sexa porque o xene de SOX2 humano localizado no locus 3q26.3 estea amplificado en diversos tipos de cancros como glioblastoma, SCLC e moitas formas de SCC (Weina, K. and Utikal, J., 2014) como porque operen outros mecanismos de regulación, por exemplo a nivel transcricional ou epixenético como acontece no caso de SCC de pel (Boumahdi, S. et al., 2014), que contribúen ao posible papel de Sox2 no proceso oncoxénico. De feito, o estudo publicado por Li, H. et al., 2012 mostrou que a expresión desregulada de Sox2 en ratos deficientes para *p27* contribúe ao desenvolvemento de tumores hipofisarios. No noso caso, para determinar se os niveis aumentados de Sox2 en células diferenciadas que perden *Rb* poderían contribuír ao desenvolvemento tumoral, empregamos ratos heterocigotos para *Rb*, que desenvolven tumores hipofisarios tras a perda estocástica do segundo alelo de *Rb* (Jacks, T. et al., 1992). A nosa primeira observación foi que as hipófises pretumorais procedentes de ratos

heterocigotos para *Rb*, presentaban maiores niveis de Sox2 en comparación cas hipófises de ratos wt, un dato consistente cos resultados que obtivemos anteriormente en MEFs deficientes para *Rb*. Para investigar se as células Sox2 positivas contribúen á aparición de tumores hipofisarios, cruzamos o modelo transxénico Sox2-TK, que alberga o xene da *Timidina Kinasa* truncada do HSV-1 no locus endóxeno de Sox2 (Arnold, K. et al., 2011), co rato heterocigoto para *Rb*, o que nos permitiu xerar ratos transxénicos *Rb*-het/Sox2-TK. A administración intraperitoneal repetitiva de GCV a estes ratos *Rb*-het/Sox2-TK provocou diferentes graos de eliminación das células Sox2 positivas. No que concirne á masa hipofisaria o que observamos foi que os ratos *Rb*-het/Sox2-TK tratados con GCV teñen unhas hipófises máis pequenas en comparación cas do grupo de ratos control tratados con HBSS, e que ademais, estas presentaban unha morfoloxía normal, un número de células Sox2 positivas reducido e unha baixa proliferación celular. Polo que todo indica que a falta de *Rb* provoca unha desregulación *in vivo* de Sox2 que conduce á aparición de tumores hipofisarios. Así mesmo, Marius Wernig e colaboradores (Kareta, M.S. et al., 2015), cruzaron o rato *Rosa26^{CreER} Rb^{lox/lox}* co rato *Sox2^{lox/lox}* co obxectivo de determinar ao igual que nós se a desrepresión de Sox2 observada en células deficientes e *Rb* podería ser relevante para a iniciación do cancro. Os seus resultados mostraron que a eliminación de *Rb* con TAM conduciu a un engrandecemento significativo da hipófise ás 9 semanas, como era de esperar. Ademais, a perda de Sox2 bloqueou completamente este fenotipo cancerixeno, independentemente do xénero, e inhibiu a proliferación celular na hipófise destes ratos mutantes para *Rb*.

Aínda que se precisa a realización de estudos adicionais, os resultados obtidos en ambos traballos están en liña cas observacións previas de tamaño hipofisario e desenvolvemento tumoral reducido que presentaban os ratos deficientes para *p27* no contexto dunha expresión de Sox2 máis baixa usando ratos heterocigotos para Sox2 (Li, H. et al., 2012). Curiosamente, aínda que *Rb* está ubicuamente expresado e a súa inactivación é un evento extremadamente frecuente en cancro, a eliminación de *Rb* en ratos é un evento iniciador de tumores só para algúns tipos celulares específicos. Neste sentido, é tentador especular que a perda de *Rb* podería resultar na expresión pro-tumoxénica de Sox2 só para estes tipos celulares.

Como comentamos ao principio deste apartado, os MEFs carentes de *Rb* ou *p130*, pero non de *p107*, mostran niveis incrementados de Sox2 debido a unha represión defectuosa da transcrición deste xene. Curiosamente, cando se analiza a expresión de Sox2 en MEFs carentes de *Rb*, *p107* e *p130* inmortalizados mediante un shRNA contra *p53* (shp53), observamos un maior incremento na expresión de Sox2 especificamente en MEFs deficientes para *Rb* ou *p130*, pero non en células wt ou deficientes en *p107*. De forma similar, os MEFs inmortalizados pola expresión da oncoproteína viral antixeno LT do SV40, a cal é capaz de bloquear as vías supresoras de tumores controladas por *p53* e as tres proteínas *pocket* (Levine, A.J., 2009), tamén mostraron niveis de Sox2 incrementados. Non obstante, como xa citamos anteriormente, o KD de *p53* despois da expresión do shp53 non causa un incremento de Sox2 en MEFs wt, polo que parece que isto só acontece en célu-

las deficientes en Rb ou p130, que xa están sometidas a algún tipo de desregulación con respecto á expresión de Sox2. Para corroborar isto último, empregamos i4F-MEFs e i4F-MEFs inmortalizados cun shp53, que transfectamos co repoteiro de pluripotencia EOS-GFP. Os i4F-MEFs-shp53 presentaron unha maior proporción de células positivas para GFP, unha maior intensidade da expresión de GFP e un incremento notable dos niveis de Sox2. De novo, os niveis de Sox2 non aumentaron cando as células wt foron transducidas co shp53 polo que a diminución dos niveis de p53 amplifica a expresión de Sox2 desregulada previamente, aínda cando esta desregulación inicial provén dunhas pequenas fugas de expresión do casete transxénico. En resumo, estes resultados mostran que a perda de p53 conduce a maiores niveis de expresión de Sox2 só cando están previamente desregulados pola deficiencia de Rb ou p130.

En conxunto, os nosos resultados desvelan un mecanismo sen precedente da iniciación tumoral mediada pola perda do control axeitado exercido pola familia retinoblastoma das proteínas *pocket* na represión de xenes, como Sox2, con funcións cruciais na regulación das propiedades de células proxenitoras ou nai adultas. Ademais, as nosas observacións apoian a idea de que os ensaios de reprogramación celular poden empregarse como sistemas celulares para identificar os mecanismos moleculares que operan na bioloxía das células nai, na desdiferenciación celular e na transformación oncoxénica.

2. REGULACIÓN DE SOX2 POR p53 EN CANCRO

Os resultados anteriores obtidos no noso laboratorio, mostráronos que unha represión defectuosa da transcripción de Sox2 en ausencia de Rb ou p130 resulta na expresión detectable duns niveis baixos, aínda que reproducibles, deste xene en MEFs e que a perda de p53 conduce a maiores niveis de expresión de Sox2 só cando están previamente desregulados. Este resultado xunto co coñecemento da implicación de Sox2 no proceso oncoxénico (Weina, K. and Utikal, J., 2014), levounos a investigar o papel de p53 na regulación transcrricional de Sox2 en cancro.

En primeiro lugar, os resultados obtidos neste traballo mostran que a alteración dos niveis de p53 modula a expresión de Sox2 en liñas celulares de cancro de pulmón (H1299 e A549) e glioblastoma (U-373 MG e U-87 MG) humanas, xa que a presenza de p53 reduce os niveis de Sox2 tanto a nivel proteico como de mRNA mentres a ausencia deste provoca un aumento. Ademais, observouse que p53 ten un efecto no promotor do xene Sox2, pois a alteración dos niveis de p53 modula a actividade transcrricional do promotor de Sox2 nestas liñas celulares.

Esta influencia de p53 na expresión de Sox2 en cancro, corroborouse mediante a realización dun experimento onde inducimos a expresión de p53 en dúas liñas celulares de glioblastoma de rato (T653 e T731) tras o tratamento co quimioterápico Doxorrubicina. Os nosos resultados mostraron que a indución de p53 por Doxorrubicina, un axente que dana o DNA, reprime a expresión de Sox2 a nivel proteico e transcrricional dunha forma dependente do tempo nestas liñas celulares. Así mesmo, tamén observamos que a ausencia de p53 impide a represión de

Sox2 tras o tratamento con Doxorrubicina en ambas liñas celulares de glioblastoma de rato.

Finalmente, a realización de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina a partir de extractos procedentes da liña celular de glioblastoma de rato T731 tratada con Doxorrubicina, mostrounos que p53 únese tanto ao promotor como ás dúas rexións reguladoras de Sox2, implicadas na expresión de Sox2 en ESCs e outros tipos celulares (Miyagi, S. et al., 2004; Tomioka, M. et al., 2002) denominadas *enhancer* SRR1 e SRR2.

En definitiva, os resultados citados até o de agora, mostran que p53 é capaz de reprimir a expresión de Sox2 en diferentes liñas celulares tumorais. Non obstante, aínda que os nosos datos mostren que p53 se une directamente ao promotor como ás dúas rexións reguladoras de Sox2, o *enhancer* SRR1 e SRR2, cremos necesario a realización de experimentos adicionais que nos permitan determinar con certeza a maneira na que p53 regula a transcripción de Sox2 nestas liñas tumorais.

En relación ao anteriormente mencionado, de maneira interesante, existen diferentes estudos na literatura que mostran que p53 regula a expresión de diferentes factores de pluripotencia nas ESCs. De feito, Yang Xu e colaboradores (Lin, T. et al., 2005) mostraron que tras dano no DNA inducido tanto por radiación UV como polo tratamento con Doxorrubicina, p53 únese ao promotor do xene de pluripotencia *Nanog* e reprime a súa expresión inducendo a diferenciación das mESCs. Máis recentemente, Jing Huang e colaboradores (Li, M. et al., 2012) demostran que p53 reprime moitos xenes que codifican para reguladores da transcripción clave nas mESCs, entre eles, os factores de pluripotencia Oct4, *Nanog*, c-Myc e Sox2. En concreto, os seus experimentos mostran que a represión destes xenes nas mESCs por p53 tras o tratamento con Doxorrubicina ten un efecto dependente da dose. Ademais, para descartar a posibilidade de que a represión destes xenes se limite á Doxorrubicina, eles tamén trataron as células con afidicolina, un inhibidor da DNA polimerasa que induce respostas a dano no DNA e ao estrés replicativo (Sheaff et al., 1991). Neste caso, eles observaron unha represión dependente de p53 similar con este tratamento, suxerindo que a represión destes xenes non é específica da Doxorrubicina. Polo tanto, en conxunto, os seus resultados indican que a represión destes xenes depende de p53. Alén disto, os autores deste traballo suxiren que a unión de p53 á rexión ou *enhancer* distal é un dos mecanismos subxacentes da represión xénica mediada por p53.

Ademais de regular a expresión de Sox2 en ESCs (Li, M. et al., 2012), un estudo realizado por Richard G. Pestell e colaboradores (Chen, K. et al., 2013) mostrou que p53 tamén regula a expresión deste xene de pluripotencia nunha liña celular de carcinoma de pulmón denominada H1299. Neste traballo, os autores revelan que p53 reprime a expresión de Sox2 tras realizar unha análise transcrricional usando o promotor de Sox2 unido a un xene repoteiro luciferasa nesta liña celular de NSCLC.

Por outro lado, tendo en conta os resultados previos do noso laboratorio que mostraron que a perda de p53 en fibroblastos de rato conduce a maiores niveis

DISCUSIÓN

de expresión de Sox2 só cando están previamente desregulados pola deficiencia de Rb ou p130, nós suxerimos que a inactivación ou falta de p53 pode ter efectos sinérxicos sobre os procesos canceríxenos mediante o incremento da expresión desregulada de xenes tales como Sox2 cuxo aumento podería ser iniciado por unha desregulación previa, como a perda de Rb. En relación a esta posible hipótese, moi recentemente publicáronse de maneira simultánea dous estudos realizados por Charles L. Sawyers e colaboradores (Mu, P. et al., 2017) e David W. Goodrich e colaboradores (Ku, S.Y. et al., 2017) que mostran que a perda dos xenes RB1 e TP53 en cancro de próstata provoca unha indución dos niveis de expresión de SOX2 que promove a plasticidade de liñaxe e a resistencia á terapia de privación de andróxenos.

Dado que diversos estudos mostraron que Sox2 contribúe aos procesos fisiolóxicos ou patofisiolóxicos das células canceríxenas (Weina, K. and Utikal, J., 2014), nós decidimos estudar o efecto que tería o incremento dos niveis de Sox2 en dúas liñas celulares humanas de cancro de pulmón (A549) e mama (MCF7). Este aumento dos niveis de Sox2 realizouse transducindo ambas liñas tumorais cun repoteiro EOS-GFP que tras a súa selección marcou unha poboación homoxénea aparentemente positiva para Sox2 ou sobreexpresando Sox2 de forma ectópica. Posteriormente, verificamos mediante Western blot e qRT-PCR que estas células presentaban maiores niveis de Sox2, e observamos que o aumento dos niveis Sox2 é máis notable no caso das células que sobreexpresan Sox2. En primeiro lugar, os nosos resultados mostraron que o incremento dos niveis de Sox2 reduce a capacidade proliferativa e de formación de colonias nestes tipos celulares tumorais. Así mesmo, atopamos que as células canceríxenas con maiores niveis de expresión de Sox2 presentaban cambios morfolóxicos e moleculares característicos de EMT, como un fenotipo máis mesenquimal e cambios na expresión de xenes clave implicados neste proceso que inclúen a E-cadherina e Vimentina, entre outros. Ademais de mostrar que o incremento dos niveis de Sox2 induce o proceso de EMT, os nosos datos tamén suxiren que este promove a migración celular.

Como xa se mencionou na revisión da literatura científica reflectida na introdución, SOX2, polo xeral, promove a proliferación celular en diferentes tipos de cancro, como cancro de mama, pulmón, próstata, páncreas e cerviz (Chou, Y.-T. et al., 2013; Herreros-Villanueva, M. et al., 2013; Ji, J. and Zheng, P.-S., 2010; Jia, X. et al., 2011; Stolzenburg, S. et al., 2012). Non obstante, os resultados observados nestes estudos difiren cos atopados no noso grupo, onde mostramos que un incremento dos niveis de Sox2 diminúe a capacidade proliferativa das células A549 e MCF7. No que concirne a esta situación, é de notar que a implicación de Sox2 na proliferación celular foi discutida de forma controvertida no caso do cancro colorectal ou gástrico, onde algúns autores sosteñen que SOX2 promove a proliferación e outros que a inhibe (Fang, X. et al., 2010; Hütz, K. et al., 2014; Liu, H. et al., 2013; Otsubo, T. et al., 2008). Ademais, un estudo publicado por Biaoyang Lin e colaboradores (Lou, X. et al., 2013) revelou que SOX2 inhibe a proliferación celular ao reducir a porcentaxe de células na fase S nas células A2780 de cancro de ovario. Polo tanto, este efecto contraditorio de Sox2 na proliferación celular suxire que

Sox2 xoga un papel diferencial dependendo do tipo de cancro.

Con respecto á formación de colonias, os estudos publicados até o momento mostran que a sobreexpresión de SOX2 incrementa o número de colonias formadas nos ensaios de clonoxenicidade *in vitro* en diferentes tipos celulares tumorais, como cancro de ovario (Lou, X. et al., 2013) e cerviz (Ji, J. and Zheng, P.S., 2010), mentres que o silenciamento do xene SOX2 reduce a capacidade de formación de colonias en cancro de mama (Stolzenburg, S. et al., 2012). Os presentes achados non parecen ser consistentes cos das nosas investigacións, que mostraron que Sox2 diminúe a capacidade clonoxénica das células de cancro de pulmón e mama.

O proceso de EMT foi recoñecido por primeira vez como unha característica do desenvolvemento embrionario, e atopouse que desempeña un papel crucial na progresión do cancro. Como resultado, as células perden polaridade e, polo tanto, adquiren mobilidade para facilitar a invasión e a metástase do tumor. A característica epitelial de adhesión célula a célula substitúese pola mobilidade invasiva, unha característica das células mesenquimais (Yang, J. and Weinberg, R.A., 2008). A asociación de EMT con SOX2 foi reportada por primeira vez por Biaoyang Lin e colaboradores (Han, X. et al., 2012), que mostraron que o silenciamento de SOX2 nas células de cancro colorectal induciu a transición mesénquima-epitelio (MET, *Mesenchymal-Epithelial Transition*), un proceso recíproco a EMT. Posteriormente, estudos *in vitro* con células cancerixenas de mama, próstata, larinxe, páncreas e de carcinoma hepatocelular tamén mostraron que a sobreexpresión de SOX2 promove o proceso de EMT (Herreros-Villanueva, M. et al., 2013; Li, X. et al., 2013; Sun, C. et al., 2013; Yang, N. et al., 2014; Yang, N. et al., 2014). Ademais, un estudo levado a cabo por Angel García Martín e colaboradores (Iglesias, J.M. et al., 2014), mostrou que a activación dun repoteiro transcrricional EOS-GFP moi similar ao empregado por nós nos nosos experimentos que tamén responde a Sox2 e Oct4, en liñas celulares de cancro mama, é dinámica e identifica unha subpoboación de células con maior potencial tumorixénico. De maneira interesante, as células nas cales o repoteiro está activo expresan xenos relacionados co proceso de EMT, como SLUG e NEDD9. En consistencia con estes estudos, os nosos resultados mostran que Sox2 provoca cambios morfolóxicos e moleculares característicos de EMT o que suxire que Sox2 promove o proceso de EMT en células de cancro de pulmón e mama.

Durante o proceso de EMT, as células tumorais adquiren unha maior capacidade de migración e obteñen propiedades invasivas para facilitar a súa integración en tecidos circundantes, ou en órganos remotos. Polo tanto, a migración e a invasión celular, son outras das características que definen ao proceso de EMT (Kalluri, R. and Weinberg, R.A., 2009). Diversos estudos mostraron que SOX2 promove a invasión, a migración celular e a metástase en cancro ovárico, gástrico, glioma, cancro colorectal, melanoma e carcinoma hepatocelular (Alonso, M.M. et al., 2011; Girouard, S.D. et al., 2012; Han, X. et al., 2012; Lou, X. et al., 2013; Sun, C. et al., 2013). Neste senso, estes resultados concordan co observado no noso grupo con respecto á migración, onde revelamos que o incremento dos niveis de Sox2 promove a

migración celular en cancro de pulmón e mama.

Varias evidencias recentes suxeriren que o proceso de EMT das células tumorais xoga un papel importante na progresión tumoral, non só en termos de maior capacidade migratoria, invasiva e metastática, senón que tamén contribúe á resistencia a quimioterápicos (Singh, A. and Settleman, J., 2010; Wang, J. et al., 2016). Como xa mencionamos con anterioridade, varios estudos mostraron que Sox2 promove a migración, a invasión e a metástase en diferentes tipos celulares tumorais. Con respecto á resistencia a quimioterápicos, un estudo realizado por María del Mar Vivanco e colaboradores (Piva, M. et al., 2014) mostrou que Sox2 promove a resistencia a TAM en células de cancro de mama. Visto que os nosos resultados mostran que Sox2 promove o proceso de EMT e unha maior migración celular das células tumorais de pulmón e mamá, consideramos interesante avaliar nun futuro próximo se niveis incrementados de Sox2 lle darían ás células cancerixenas unha maior capacidade invasiva e metastásica e de quimioresistencia.

O supresor tumoral p53 está implicado en múltiples procesos celulares, como arresto do ciclo celular, apoptose, autofaxia, senescencia e homeostase metabólica, entre outros (Olovnikov, I.A. et al., 2009; Rodier, F. et al., 2007; Ryan, K.M. et al., 2001). De maneira específica, p53 sitúase no centro das vías de resposta ao estrés que impiden o crecemento e a supervivencia das células tumorais, actuando polo tanto como supresor tumoral (Harris, C.C., 1996). Como un factor de transcrición clave, p53 regula a transcrición de varios xenes diana que están relacionados con varias vías (Harris, C.C., 1996; Jerry, D.J. et al., 2008). Ademais, varios estudos mostraron que aberracións na expresión de p53 poden promover a iniciación e a progresión tumoral por parte das CSCs (Godar, S. et al., 2008; Zhang, M. et al., 2008). Neste senso, un estudo levado a cabo por Robert A. Weinberg e colaboradores (Godar, S. et al., 2008) demostrou que p53 podería suprimir directamente a expresión de CD44, e esta supresión inhibiu o crecemento e a capacidade iniciadora de tumores das células epiteliais mamarias altamente tumorixénicas. Por outro lado, no ano 2014, Scott W. Lowe e colaboradores (Tschaharganeh, D.F. et al., 2014) revelaron que p53 pode reprimir a expresión de Nestina a través dun mecanismo indirecto que restrinxe a tumorixénese no fígado ao limitar a plasticidade celular e a expansión de poboacións tipo proxenitor en resposta a estrés oncoxénico e que Nestina é requirida durante a inactivación de p53 para promover a tumorixénese neste órgano. Ademais, mostraron que a perda de p53 permite a desdiferenciación de hepatocitos maduros en resposta a un estímulo oncoxénico, conducindo á expansión de células proxenitoras reprogramadas malignas que son capaces de adquirir características de carcinoma hepatocelular (HCC, *hepatocellular carcinoma*) ou colanxiocarcinoma intrahepático (CC, *cholangiocarcinoma*), tras adquirir eventos oncoxénicos específicos de liñaxe. Recentemente, JM Han e colaboradores (Park, E.K. et al., 2015), tamén mostraron que p53 reprime transcricionalmente ao marcador de CSCs CD133, o que conduce a unha inhibición da proliferación e da formación de tumores en diferentes liñas celulares tumorais. Ademais, como xa comentamos anteriormente, p53 reprime a expresión de diferentes factores de pluripotencia (Oct4, Nanog, c-Myc e Sox2) nas ESCs (Li, M. et al., 2012; Lin, T. et al.,

2005), e mesmo a Sox2 na liña celular de carcinoma de pulmón H1299 (Chen, K. et al., 2013).

Tendo en conta isto e os nosos resultados que mostran que p53 reprime a expresión de Sox2 en varias liñas celulares tumorais humanas e de rato e que un incremento dos niveis de Sox2 nalgúns destas liñas reduce a proliferación celular e a capacidade de formación de colonias, á vez que promove o proceso de EMT e a migración celular, nós suxerimos que mutacións ou alteracións no supresor tumoral p53 conducirían a un incremento dos niveis de expresión de factores de pluripotencia como Sox2, que promoven características de plasticidade celular, EMT e en definitiva de maior malignidade.

3. PAPEL DAS CÉLULAS NAI E PROXENITORAS ADULTAS SOX2 POSITIVAS EN AVELLENTAMENTO

O esgotamento de células nai constitúe unha das nove características que contribúen ao proceso de avellentamento e que determinan o fenotipo de avellentamento en diferentes organismos (López-Otín, C. et al., 2013). Tendo en conta isto, e que Sox2 marca poboacións de células nai e proxenitoras en varios tecidos adultos (Arnold, K. et al., 2011), quixemos investigar o papel das células nai e proxenitoras Sox2 positivas no proceso de avellentamento.

En primeiro lugar, para levar a cabo esta investigación, eliminamos as células nai e proxenitoras Sox2 positivas administrando GCV intraperitonealmente de forma reiterada aos ratos KI Sox2-TK cada dúas semanas durante 54 ou 34 semanas até o seu sacrificio dúas semanas despois da última administración. A pesar de que en ambos os casos o número de animais incluídos neste estudo non foi moi alto, observamos que estes animais que sufriron un grao diferente de eliminación de células Sox2 positivas, tenden a presentar un tamaño corporal reducido e en consecuencia unha menor masa corporal ou ganancia da mesma. A aparencia externa destes animais pon de manifesto un fenotipo de avellentamento prematuro que se caracteriza por un aspecto en xeral desmellorado, a presenza de cifose, canas e unha menor capacidade de rexeneración do pelo. Ademais, estes animais tamén teñen unha porcentaxe de masa graxa corporal inferior, que só é estatisticamente significativa no caso dos machos. Tras o seu sacrificio, a análise histolóxica e molecular dos tecidos mostrou que os riles destes animais acumulan un maior número de células senescentes como o reflectiu unha maior actividade β -galactosidasa e un incremento na expresión de marcadores do proceso de senescencia celular. Así mesmo, observamos que visualmente algúns órganos destes animais, entre eles, os testículos e os pulmóns, presentan un tamaño inferior e algúns deles alteracións na súa homeostase tisular. Polo tanto, todo parece indicar que a eliminación reiterada de células Sox2 positivas a longo prazo provoca un fenotipo de avellentamento prematuro sistémico.

Como xa mencionamos na introdución, Konrad Hochedlinger e colaboradores (Arnold, K. et al., 2011), tamén empregaron o modelo animal Sox2-TK para estudar se as células Sox2 positivas que marcaban células nai en varios tecidos epiteliais

DISCUSIÓN

eran esenciais para o mantemento dos tecidos e para a viabilidade dos ratos. Neste caso, para administrar o GCV, implantaron de forma subcutánea unhas bombas osmóticas no costado dos ratos, o cal permitiu liberar sistematicamente unha dose constante de GCV durante 2 semanas, realizando así un tratamento agudo. Os seus primeiros resultados mostraron que aos 7 días os animais presentaban un aspecto enfermizo xunto cun tamaño pequeno e que á semana seguinte morrían seguramente debido ao desenvolvemento de úlceras de estómago e da mucosa oral. Unha análise histolóxica detallada destes ratos revelou que as capas de células Sox2 positivas que están máis preto á membrana basal estaban ausentes en tecidos como o estómago, lingua e esófago, coincidindo coa falta de expresión de Sox2 nestas células. Ademais, tamén detectaron inflamación severa, formación de edemas e células atípicas en estómago e lingua. Polo tanto, estes datos mostraron que as células Sox2 positivas son esenciais para o mantemento normal dos tecidos e en último caso para a supervivencia dos ratos. Non obstante, cando eles suministraban GCV só durante 7 días e logo retiraban o tratamento, os animais eran capaces de recuperar gradualmente nas seguintes semanas, o que indica que este fenotipo mórbido é en efecto, reversible. Así que, en conxunto, os seus experimentos mostraron que as células Sox2 positivas son en efecto células nai adultas con capacidade para rexenerar os tecidos. É de importancia sinalar, que o protocolo experimental empregado no noso traballo de investigación consistiu precisamente en forzar esta rexeneración dos tecidos de maneira reiterada ao longo do tempo, deixando pasar 2 semanas entre cada administración de GCV.

Certos tipos de disfuncións relacionadas coa idade das células nai, tales como a perda da capacidade para autorrenovarse e a activación de vías de senescencia, poden conducir á redución dos compartimentos de células nai adultas. Neste senso, na literatura científica atopamos varios exemplos que revelan que unha redución relacionada coa idade no número de células nai parece ser a responsable de fenotipos de avellentamento específicos nalgúns tecidos (Inomata, K. et al., 2009; Kuhn, H. et al., 1996; Maslov, A.Y. et al., 2004; Nishimura, E.K. et al., 2005; Renault, V.M. et al., 2009). Entre estes exemplos, está a redución de células nai melonocíticas nos folículos pilosos e a aparición de melanocitos pigmentados maduros no nicho das células nai tanto en ratos como en humanos avellentados (Inomata, K. et al., 2009; Nishimura, E.K. et al., 2005), que conduciu a un dos cambios fenotípicos máis visibles durante o avellentamento, a aparición de canas. Outro caso é o das NSCs, onde unha redución no número destas células nai tamén está posiblemente relacionado coa perda específica da capacidade de autorrenovación e parece ser responsable da declinación da neuroxénese coa idade (Molofsky, A. V et al., 2006; Nishino, J. et al., 2008; Renault, V.M. et al., 2009).

Recentemente, un estudo levado a cabo por Mariano Barbacid e colaboradores (Ganuza, M. et al., 2012), mostrou ao igual que nós, que o esgotamento de compartimentos de células nai provoca un fenotipo de avellentamento prematuro sistémico. En concreto, os autores deste estudo investigaron as consecuencias da eliminación xeneralizada de Cdk7, un membro da familia das CDKs, nos tecidos adultos. Para isto, eles empregaron ratos transxénicos *Cdk7^{lox/lox};Ub-CreERT2^{+/T}*.

A exposición destes ratos a unha dieta que contén TAM permitiu a eliminación dos alelos *Cdk7*. A perda xeneralizada da expresión de *Cdk7* en ratos novos adultos non conduciu a un fenotipo obvio. Ademais, os órganos con baixa proliferación como o fígado, o ril ou o cerebro, exhibiron unha histoloxía normal e os animais mantiveron niveis estándar de parámetros fisiolóxicos a pesar da perda extensa da expresión de *Cdk7* nestes tecidos. Polo tanto, parece que *Cdk7* non é esencial para o mantemento da homeostase tisular en órganos con baixa taxa de proliferación. Pola contra, os tecidos altamente proliferativos como o intestino ou a pel reteñen a expresión de *Cdk7* na maioría das súas células, probablemente como consecuencia da eficiente substitución das células que perden *Cdk7* por células que derivan dun conxunto de células nai que retiveron a expresión desta quinasa, mantendo así a función normal dos órganos. De ser certa esta hipótese, unha demanda continua de células nai adultas resultaría nun esgotamento prematuro que conduciría á aparición de fenotipos de avellentamento. De feito, os ratos *Cdk7^{lox/lox};Ub-CreERT2^{+/T}* expostos a unha dieta continua de TAM desenvolveron unha gran variedade de fenotipos relacionados coa idade como perda de masa corporal, alopecia difusa, canas e cifose, consistentes cos observados no noso estudo. Ademais, estes ratos sufriron morte prematura con menos dun 20% dos animais sobrevivindo máis dun ano. A caracterización adicional dos seus tecidos revelou defectos característicos do avellentamento prematuro como diminución do contido mineral óseo, acumulación de adipocitos na medula ósea e a presenza de hepatocitos positivos para a histona fosforilada γ -H2AX. Ademais, os ratos *Cdk7^{lox/lox};Ub-CreERT2^{+/T}* presentaron criptas e vilosidades hipoplásicas no intestino delgado, así como nefropatía progresiva e calcificación medular severa nos seus riles. A súa pel tamén mostrou marcas fenotípicas asociadas con avellentamento prematuro que inclúen adelgazamento da derme, a perda da capa adiposa subcutánea e a transformación do epitelio folicular en glándulas sebáceas. Ademais, a rexión do bulbo dos folículos pilosos tiña un número limitado de células proxenitoras. Finalmente, o aumento substancial na porcentaxe de telómeros curtos na epiderme reforza a hipótese de que o compartimento de células nai en animais *Cdk7^{lox/lox};Ub-CreERT2^{+/T}* adultos sufriu un período proliferativo prolongado.

Polo tanto, a hipótese de que o avellentamento pode ser resultado dun esgotamento das células nai adultas é compatible cos resultados obtidos no noso estudo cun modelo de eliminación continuada das células Sox2 positivas.

CONCLUSIÓN



Do presente traballo pódense extraer as seguintes conclusións:

1. A falta de Rb e p130 pero non de p107, provoca unha represión defectuosa da transcrición de Sox2 que resulta nun incremento dos niveis de Sox2 en células primarias.
2. Os tres membros das proteínas *pocket* únense ao *enhancer* Sox2-SRR2, pero só a ausencia de Rb e p130 altera as marcas epixenéticas no *enhancer*.
3. A ausencia de Rb permite a reprogramación a iPSCs sen necesidade de Sox2 ectópico.
4. A eliminación de células Sox2 positivas reduce o desenvolvemento tumoral hipofisario en ratos heterocigotos para Rb.
5. A perda de p53 en células primarias con desregulación previa de Sox2 por falta de Rb ou p130 conduce a maiores niveis de expresión de Sox2.
6. p53 reprime a expresión de Sox2 en varias liñas celulares tumorais humanas e de rato.
7. O incremento dos niveis de Sox2, en dúas liñas celulares tumorais humanas, reduce a proliferación celular e a capacidade de formación de colonias, á vez que promove o proceso de EMT e a migración celular.
8. A eliminación reiterada de células nai e proxenitoras Sox2 positivas en rato provoca a aparición dun fenotipo de avellentamento prematuro.



BIBLIOGRAFÍA



Abad, M. et al. 2013. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 502, 7471 (Oct. 2013), 340–5.

Aleem, E. et al. 2005. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature cell biology*. 7, 8 (Aug. 2005), 831–6.

Almendro, V. et al. 2013. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annual review of pathology*. 8, (Jan. 2013), 277–302.

Alonso, M.M. et al. 2011. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PloS one*. 6, 11 (Jan. 2011), e26740.

Ambrosetti, D.C. et al. 2000. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *The Journal of biological chemistry*. 275, 30 (Jul. 2000), 23387–97.

Annovazzi, L. et al. 2011. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer genomics & proteomics*. 8, 3 (Jan.2011), 139–47.

Apostolou, E. and Hochedlinger, K. 2013. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*. 502, 7472 (Oct. 2013), 462–71.

Arnold, K. et al. 2011. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell*. 9, 4 (Oct. 2011), 317–29.

Avilion, A.A. et al. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development*. 17, 1 (Jan. 2003), 126–40.

Badis, G. et al. 2009. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*. 324, 5935 (Jun. 2009), 1720–3.

Banito, A. et al. 2009. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & development*. 23, 18 (Sep. 2009), 2134–9.

Bass, A.J. et al. 2009. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics*. 41, 11 (Nov. 2009), 1238–42.

Bassaneze, V. et al. 2008. A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Analytical biochemistry*. 372, 2 (Jan. 2008), 198–203.

Basu-Roy, U. et al. 2012. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene*. 31, 18 (May 2012), 2270–82.

Beachy, P.A. et al. 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*. 432, 7015 (Nov. 2004), 324–31.

Bell, D.R. and Van Zant, G. 2004. Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene*. 23, 43 (Sep. 2004), 7290–6.

Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 37, 5 (May 2005), 961–76.

BIBLIOGRAFÍA

Ben-Porath, I. et al. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics*. 40, 5 (May 2008), 499–507.

Berger, S.L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 447, 7143 (May 2007), 407–12.

Bernstein, B.E. et al. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 125, 2 (Apr. 2006), 315–26.

Besson, A. et al. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*. 14, 2 (Feb. 2008), 159–69.

Bieberich, E. and Wang, G. 2013. Molecular Mechanisms Underlying Pluripotency. *Pluripotent Stem Cells*. InTech.

Bieging, K.T. et al. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature reviews. Cancer*. 14, 5 (May 2014), 359–70.

Biernaskie, J. et al. 2009. SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell stem cell*. 5, 6 (Dec. 2009), 610–23.

Bindu A, H. and B, S. 2011. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 01, 03 (Jan. 2011).

Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*. 7, 6 (Nov. 1979), 1513–23.

Boer, B. et al. 2007. Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic acids research*. 35, 6 (Jan. 2007), 1773–86.

Booth, C. and Potten, C.S. 2000. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 105, 11 (Jun. 2000), 1493–9.

Boumahdi, S. et al. 2014. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature*. 511, 7508 (Jul. 2014), 246–50.

Boussif, O. et al. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 16 (Aug. 1995), 7297–301.

Bowles, J. et al. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental biology*. 227, 2 (Nov. 2000), 239–55.

Boyer, L.A. et al. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 122, 6 (Sep. 2005), 947–56.

Brack, A.S. and Rando, T.A. 2007. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem cell reviews*. 3, 3 (Jan. 2007), 226–37.

Brack, A.S. et al. 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* (New York, N.Y.). 317, 5839 (Aug. 2007), 807–10.

Brack, A.S. et al. 2008. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell stem cell*. 2, 1 (Jan. 2008), 50–9.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72, (May 1976), 248–54.

Bradley, A. et al. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 309, 5965 (Jan. 1984), 255–6.

Brady, C.A. and Attardi, L.D. 2010. p53 at a glance. *Journal of cell science*. 123, Pt 15 (Aug. 2010), 2527–32.

Breen, L. et al. 2007. Investigation of the role of p53 in chemotherapy resistance of lung cancer cell lines. *Anticancer research*. 27, 3A (Jan. 2007), 1361–4.

Buganim, Y. et al. 2012. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*. 150, 6 (Sep. 2012), 1209–22.

Burkhardt, D.L. and Sage, J. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature reviews. Cancer*. 8, 9 (Sep. 2008), 671–82.

Busuttil, R. et al. 2007. Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. *Neuroscience*. 145, 4 (Apr. 2007), 1341–7.

Campisi, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120, 4 (Feb. 2005), 513–22.

Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8, 9 (Sep. 2007), 729–40.

Carey, B.W. et al. 2010. Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nature methods*. 7, 1 (Jan. 2010), 56–9.

Chang, C. 1996. p53 Is a Mediator for Radiation-repressed Human TR2 Orphan Receptor Expression in MCF-7 Cells, a New Pathway from Tumor Suppressor to Member of the Steroid Receptor Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 25 (Jun. 1996), 14649–14652.

Chen, J. et al. 2011. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell research*. 21, 1 (Jan. 2011), 205–12.

Chen, J. et al. 2013. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nature genetics*. 45, 1 (Jan. 2013), 34–42.

BIBLIOGRAFÍA

Chen, K. et al. 2013. Dachshund Binds p53 to Block the Growth of Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancer Research*. 73, 11 (Jun. 2013), 3262–3274.

Chen, L. 2012. A Balanced Network: Transcriptional Regulation in Pluripotent Stem Cells. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 01, S10 (May 2012).

Chen, S. et al. 2014. SOX2 regulates apoptosis through MAP4K4-survivin signaling pathway in human lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 35, 3 (Mar. 2014), 613–23.

Chen, X. et al. 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 133, 6 (Jun. 2008), 1106–17.

Chew, J.-L. et al. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*. 25, 14 (Jul. 2005), 6031–46.

Chou, Y.-T. et al. 2013. The Emerging Role of SOX2 in Cell Proliferation and Survival and Its Crosstalk with Oncogenic Signaling in Lung Cancer. *Stem Cells*. 31, 12 (Dec. 2013), 2607–2619.

Cobrinik, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. 24, 17 (Apr. 2005), 2796–809.

Cobrinik, D. et al. 1996. Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes & development*. 10, 13 (Jul. 1996), 1633–44.

Collignon, J. et al. 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development (Cambridge, England)*. 122, 2 (Feb. 1996), 509–20.

Conboy, M.J. et al. 2007. High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS biology*. 5, 5 (May 2007), e102.

Coppé, J.-P. et al. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*. 5, (Jan. 2010), 99–118.

Cowan, C.A. et al. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*. 309, 5739 (Aug. 2005), 1369–73.

Dailey, L. and Basilico, C. 2001. Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional regulation by Sox/POU complexes. *Journal of cellular physiology*. 186, 3 (Mar. 2001), 315–28.

Daley, G.Q. 2008. Common themes of dedifferentiation in somatic cell reprogramming and cancer. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 73, (Jan. 2008), 171–4.

Danaei, G. et al. 2010. The promise of prevention: the effects of four preventable risk factors on national life expectancy and life expectancy disparities by race and county in the United States. *PLoS medicine*. 7, 3 (Mar. 2010), e1000248.

De Sousa E Melo, F. et al. 2013. Cancer heterogeneity--a multifaceted view. *EMBO reports*. 14, 8 (Aug. 2013), 686–95.

Dick, F.A. 2007. Structure-function analysis of the retinoblastoma tumor suppressor protein - is the whole a sum of its parts? *Cell division*. 2, (Sep. 2007), 26.

Dick, F.A. and Rubin, S.M. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14, 5 (May 2013), 297–306.

Dimri, G.P. et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 20 (Sep. 1995), 9363–7.

Domen, J. and Weissman, I.L. 2000. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *The Journal of experimental medicine*. 192, 12 (Dec. 2000), 1707–18.

Domen, J. et al. 1998. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood*. 91, 7 (Apr. 1998), 2272–82.

Dong, C. et al. 2004. Sox genes and cancer. *Cytogenetic and genome research*. 105, 2–4 (Jan. 2004), 442–7.

Driskell, R.R. et al. 2009. Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development (Cambridge, England)*. 136, 16 (Aug. 2009), 2815–23.

el-Deiry, W.S. et al. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75, 4 (Nov. 1993), 817–25.

Ellis, P. et al. 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental neuroscience*. 26, 2–4 (Jan. 2004), 148–65.

Evans, M.J. and Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 5819 (Jul. 1981), 154–6.

Evdokimova, V. et al. 2009. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer cell*. 15, 5 (May 2009), 402–15.

Ewen, M.E. et al. 1991. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*. 66, 6 (Sep. 1991), 1155–64.

Fang, X. et al. 2010. ChIP-seq and functional analysis of the SOX2 gene in colorectal cancers. *Omics : a journal of integrative biology*. 14, 4 (Aug. 2010), 369–84.

Fauquier, T. et al. 2008. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 8 (Feb. 2008), 2907–12.

BIBLIOGRAFÍA

Fearon, E.R. and Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61, 5 (Jun. 1990), 759–67.

Ferletta, M. et al. 2011. Forced expression of Sox21 inhibits Sox2 and induces apoptosis in human glioma cells. *International journal of cancer*. 129, 1 (Jul. 2011), 45–60.

Fero, M.L. et al. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*. 85, 5 (May 1996), 733–44.

Flores, I. et al. 2008. The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes & development*. 22, 5 (Mar. 2008), 654–67.

Fong, H. et al. 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 26, 8 (Aug. 2008), 1931–8.

Friedenstein, A.J. et al. 1982. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Experimental hematology*. 10, 2 (Feb. 1982), 217–27.

Friend, S.H. et al. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 323, 6089 (Jan. 1986), 643–6.

Fuchs, E. et al. 2001. At the Roots of a Never-Ending Cycle. *Developmental Cell*. 1, 1 (Jul. 2001), 13–25.

Gangemi, R.M.R. et al. 2009. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 27, 1 (Jan. 2009), 40–8.

Ganuza, M. et al. 2012. Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *The EMBO Journal*. 31, 11 (May 2012), 2498–2510.

Giaccia, A.J. and Kastan, M.B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & development*. 12, 19 (Oct. 1998), 2973–83.

Giaccone, G. et al. 1992. Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer research*. 52, 9 Suppl (May 1992), 2732s–2736s.

Giangreco, A. et al. 2008. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging cell*. 7, 2 (Mar. 2008), 250–9.

Giard, D.J. et al. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 51, 5 (Nov. 1973), 1417–23.

Girlovanu, M. et al. 2015. Stem cells - biological update and cell therapy progress. *Clujul medical (1957)*. 88, 3 (Jan. 2015), 265–71

Girouard, S.D. et al. 2012. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 92, 3 (Mar. 2012), 362–70.

Godar, S. et al. 2008. Growth-Inhibitory and Tumor- Suppressive Functions of p53 Depend on Its Repression of CD44 Expression. *Cell*. 134, 1 (Jul. 2008), 62–73.

Goodell, M.A. et al. 2015. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 16, 5 (May 2015), 299–309.

Gosden, R.G. et al. 1982. Structure and gametogenic potential of seminiferous tubules in ageing mice. *Journal of reproduction and fertility*. 64, 1 (Jan. 1982), 127–33.

Graham, F.L. et al. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*. 36, 1 (Jul. 1977), 59–74.

Greenow, K. and Clarke, A.R. 2012. Controlling the stem cell compartment and regeneration in vivo: the role of pluripotency pathways. *Physiological reviews*. 92, 1 (Jan. 2012), 75–99.

Gubbay, J. et al. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 346, 6281 (Jul. 1990), 245–250.

Gupta, P.B. et al. 2009. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature medicine*. 15, 9 (Sep. 2009), 1010–2.

Gurdon, J.B. 1962. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 10, 4 (Dec. 1962), 622–640.

Hackett, J.A. and Surani, M.A. 2014. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell stem cell*. 15, 4 (Oct. 2014), 416–30.

Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. 2009. Rules for Making Human Tumor Cells. (Oct. 2009).

Han, X. et al. 2012. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PloS one*. 7, 8 (Jan. 2012), e41335.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 5 (Mar. 2011), 646–74.

Hannon, G.J. and Beach, D. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 371, 6494 (Sep. 1994), 257–61.

Harbour, J.W. et al. 1988. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science (New York, N.Y.)*. 241, 4863 (Jul. 1988), 353–7.

BIBLIOGRAFÍA

Harper, J.W. et al. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75, 4 (Nov. 1993), 805–16.

Harris, C.C. 1996. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*. 88, 20 (Oct. 1996), 1442–55.

Hayflick, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 37, (Mar. 1965), 614–36.

He, S. et al. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology*. 25, (Jan. 2009), 377–406.

Hemberger, M. et al. 2009. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10, 8 (Aug. 2009), 526–37.

Henley, S.A. and Dick, F.A. 2012. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell division*. 7, 1 (Jan. 2012), 10.

Herreros-Villanueva, M. et al. 2013. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*. 2, (Aug. 2013), e61.

Hirai, H. et al. 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and cellular biology*. 15, 5 (May 1995), 2672–81.

Hirai, H. et al. 2011. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *The Biochemical journal*. 438, 1 (Aug. 2011), 11–23.

Hockemeyer, D. et al. 2008. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*. 3, 3 (Sep. 2008), 346–53.

Hong, H. et al. 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 460, 7259 (Aug. 2009), 1132–5.

Horowitz, J.M. et al. 1989. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science (New York, N.Y.)*. 243, 4893 (Feb. 1989), 937–40.

Hotta, A. et al. 2009. Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nature methods*. 6, 5 (May 2009), 370–6.

Hsu, Y.-C. and Fuchs, E. 2012. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13, 2 (Feb. 2012), 103–14.

Hu, W. et al. 2012. The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes & cancer*. 3, 3–4 (Mar. 2012), 199–208.

Hurford, R.K. et al. 1997. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes & Development*. 11, 11 (Jun. 1997), 1447–1463.

Hütz, K. et al. 2014. The stem cell factor SOX2 regulates the tumorigenic potential in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 35, 4 (Apr. 2014), 942–50.

Iglesias, J.M. et al. 2014. The Activation of the Sox2 RR2 Pluripotency Transcriptional Reporter in Human Breast Cancer Cell Lines is Dynamic and Labels Cells with Higher Tumorigenic Potential. *Frontiers in oncology*. 4, (Jan. 2014), 308.

Indovina, P. et al. 2013. Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. *Journal of cellular physiology*. 228, 3 (Mar. 2013), 525–35.

Ingram, D.K. and Reynolds, M.A. 1986. Assessing the predictive validity of psychomotor tests as measures of biological age in mice. *Experimental aging research*. 12, 3 (Jan. 1986), 155–62.

Inomata, K. et al. 2009. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell*. 137, 6 (Jun. 2009), 1088–99.

Itoh, F. et al. 2014. Roles of TGF- β family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Seminars in cell & developmental biology*. 32, (Aug. 2014), 98–106.

Iwafuchi-Doi, M. et al. 2011. The Pou5f1/Pou3f-dependent but SoxB-independent regulation of conserved enhancer N2 initiates Sox2 expression during epiblast to neural plate stages in vertebrates. *Developmental biology*. 352, 2 (Apr. 2011), 354–66.

Jacks, T. et al. 1992. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 359, 6393 (Sep. 1992), 295–300.

Jaenisch, R. and Young, R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 132, 4 (Feb. 2008), 567–82.

Janzen, V. et al. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 443, 7110 (Sep. 2006), 421–6.

Jerry, D.J. et al. 2008. Regulation of cancer stem cells by p53. *Breast cancer research : BCR*. 10, 4 (2008), 304.

Ji, J. and Zheng, P.-S. 2010. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Human pathology*. 41, 10 (Oct. 2010), 1438–47.

Jia, L.Q. et al. 1997. Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Molecular carcinogenesis*. 19, 4 (Aug. 1997), 243–53.

Jia, X. et al. 2011. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *Journal of molecular cell biology*. 3, 4 (Aug. 2011), 230–8.

Jones, D.L. and Rando, T.A. 2011. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nature cell biology*. 13, 5 (May 2011), 506–12.

Kalaszczynska, I. et al. 2009. Cyclin A Is Redundant in Fibroblasts but Essential in Hematopoietic and Embryonic Stem Cells. *Cell*. 138, 2 (Jul. 2009), 352–365.

BIBLIOGRAFÍA

Kalluri, R. and Weinberg, R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 119, 6 (Jun. 2009), 1420–8.

Kalu, D. N. 1995. *Handbook of physiology, section 11 Aging* Oxford University Press, New York, NY.

Kamachi, Y. and Kondoh, H. 2013. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development (Cambridge, England)*. 140, 20 (Oct. 2013), 4129–44.

Kamachi, Y. et al. 1998. Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development (Cambridge, England)*. 125, 13 (Jul. 1998), 2521–32.

Kamachi, Y. et al. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG*. 16, 4 (Apr. 2000), 182–7.

Kang, L. et al. 2009. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell stem cell*. 5, 2 (Aug. 2009), 135–8.

Kareta, M.S. et al. 2015. Inhibition of Pluripotency Networks by the Rb Tumor Suppressor Restricts Reprogramming and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 16, 1 (Jan. 2015), 39–50.

Kashimada, K. and Koopman, P. 2010. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development (Cambridge, England)*. 137, 23 (Dec. 2010), 3921–30.

Kawamura, T. et al. 2009. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*. 460, 7259 (Aug. 2009), 1140–4.

Kelberman, D. et al. 2006. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *The Journal of clinical investigation*. 116, 9 (Sep. 2006), 2442–55.

Kirkwood, T.B.L. 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 120, 4 (Mar. 2005), 437–47.

Kiyokawa, H. et al. 1996. Enhanced Growth of Mice Lacking the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Function of p27Kip1. *Cell*. 85, 5 (May 1996), 721–732.

Knoblich, J.A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 132, 4 (Mar. 2008), 583–97.

Koga, H. et al. 2011. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing research reviews*. 10, 2 (Apr. 2011), 205–15.

Kondoh, H. and Kamachi, Y. 2010. SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 42, 3 (Mar. 2010), 391–9.

Kondratov, R. V et al. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & development*. 20, 14 (Jul. 2006), 1868–73.

- Koopman, P. et al. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 351, 6322 (May 1991), 117–21.
- Kopp, J.L. et al. 2008. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 26, 4 (Apr. 2008), 903–11.
- Kozar, K. et al. 2004. Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins. *Cell*. 118, 4 (Aug. 2004), 477–491.
- Krieger, T. and Simons, B.D. 2015. Dynamic stem cell heterogeneity. *Development* (Cambridge, England). 142, 8 (Apr. 2015), 1396–406.
- Krishnamurthy, J. et al. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 443, 7110 (Sep. 2006), 453–7.
- Krizhanovsky, V. and Lowe, S.W. 2009. Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature*. 460, 7259 (Aug. 2009), 1085–6.
- Ku, S.Y. et al. 2017. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science*. 355, 6320 (Jan. 2017), 78–83.
- Kuhn, H. et al. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci*. 16, 6 (Mar. 1996), 2027–2033.
- Kuilman, T. et al. 2010. The essence of senescence. *Genes & development*. 24, 22 (Nov. 2010), 2463–79.
- Kunath, T. et al. 2007. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* (Cambridge, England). 134, 16 (Aug. 2007), 2895–902.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 5259 (Aug. 1970), 680–685.
- Lamb, P. and Crawford, L. 1986. Characterization of the human p53 gene. *Molecular and cellular biology*. 6, 5 (May 1986), 1379–85.
- Lang, G.A. et al. 2004. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 119, 6 (Dec. 2004), 861–72.
- Lee, E.Y. et al. 1988. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* (New York, N.Y.). 241, 4862 (Jul. 1988), 218–21.
- Lee, M.H. et al. 1996. Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes & development*. 10, 13 (Jul. 1996), 1621–32.
- Lee, W.H. et al. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* (New York, N.Y.). 235, 4794 (Mar. 1987), 1394–9.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 88, 3 (Feb. 1997), 323–31.

BIBLIOGRAFÍA

Levine, A.J. 2009. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology*. 384, 2 (Feb. 2009), 285–93.

Levine, A.J. et al. 2004. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*. 116, 2 Suppl (Jan. 2004), S67–9, 1 p following S69.

Li, F. et al. 2010. Apoptotic Caspases Regulate Induction of iPSCs from Human Fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 7, 4 (Oct. 2010), 508–520.

Li, H. et al. 2009. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*. 460, 7259 (Aug. 2009), 1136–9.

Li, H. et al. 2012. p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell stem cell*. 11, 6 (Dec. 2012), 845–52.

Li, J. et al. 2012. Progressive alopecia reveals decreasing stem cell activation probability during aging of mice with epidermal deletion of DNA methyltransferase 1. *The Journal of investigative dermatology*. 132, 12 (Dec. 2012), 2681–90.

Li, L. and Clevers, H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science (New York, N.Y.)*. 327, 5965 (Jan. 2010), 542–5.

Li, L. et al. 2013. REGY deficiency promotes premature aging via the casein kinase 1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 27 (Jul. 2013), 11005–10.

Li, M. and Huang, J. 2010. A new puzzling role of p53 in mouse embryonic stem cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 9, 9 (May 2010), 1669–70.

Li, M. et al. 2012. Distinct regulatory mechanisms and functions for p53-activated and p53-repressed DNA damage response genes in embryonic stem cells. *Molecular cell*. 46, 1 (Apr. 2012), 30–42.

Li, X. et al. 2013. SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/ β -catenin signal network. *Cancer Letters*. 336, 2 (Aug. 2013), 379–389.

Li, Y. et al. 2014. CRISPR reveals a distal super-enhancer required for Sox2 expression in mouse embryonic stem cells. *PloS one*. 9, 12 (Jan. 2014), e114485.

Lin, T. et al. 2005. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature cell biology*. 7, 2 (Feb. 2005), 165–71.

Liu, H. et al. 2013. Sex determining region Y-box 2 inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cells through the mTOR signaling pathway. *International journal of molecular medicine*. 32, 1 (Jul. 2013), 59–66.

Liu, L. and Rando, T.A. 2011. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *The Journal of cell biology*. 193, 2 (Apr. 2011), 257–66.

Liu, L. et al. 2013. Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. *Cell reports*. 4, 1 (Jul. 2013), 189–204.

- Lobo, N.A. et al. 2007. The biology of cancer stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 23, (Jan. 2007), 675–99.
- Lois, C. et al. 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science (New York, N.Y.)*. 295, 5556 (Feb. 2002), 868–72.
- López-Otín, C. et al. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*. 153, 6 (Jun. 2013), 1194–217.
- Lou, X. et al. 2013. SOX2 targets fibronectin 1 to promote cell migration and invasion in ovarian cancer: new molecular leads for therapeutic intervention. *Omics : a journal of integrative biology*. 17, 10 (Oct. 2013), 510–8.
- Lowry, W.E. et al. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 8 (Feb. 2008), 2883–8.
- Lu, W. et al. 2014. QKI impairs self-renewal and tumorigenicity of oral cancer cells via repression of SOX2. *Cancer biology & therapy*. 15, 9 (Sep. 2014), 1174–84.
- Maherali, N. et al. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell*. 1, 1 (Jun. 2007), 55–70.
- Mali, P. et al. 2008. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 26, 8 (Aug. 2008), 1998–2005.
- Malkin, D. et al. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science (New York, N.Y.)*. 250, 4985 (Nov. 1990), 1233–8.
- Marión, R.M. et al. 2009. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 460, 7259 (Aug. 2009), 1149–53.
- Marion, R.M. et al. 2009. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 4, 2 (Feb. 2009), 141–54.
- Marks, H. et al. 2012. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell*. 149, 3 (Apr. 2012), 590–604.
- Martín, A. et al. 2005. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer cell*. 7, 6 (Jun. 2005), 591–8.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78, 12 (Dec. 1981), 7634–8.

BIBLIOGRAFÍA

Maslov, A.Y. et al. 2004. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24, 7 (Mar. 2004), 1726–33.

Massagué, J. et al. 2005. Smad transcription factors. *Genes & development*. 19, 23 (Dec. 2005), 2783–810.

Masui, S. et al. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology*. 9, 6 (Jun. 2007), 625–35.

Mayol, X. et al. 1993. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene*. 8, 9 (Sep. 1993), 2561–6.

Medema, R.H. et al. 1995. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 14 (Jul. 1995), 6289–93.

Melzer, D. et al. 2007. A common variant of the p16(INK4a) genetic region is associated with physical function in older people. *Mechanisms of ageing and development*. 128, 5–6 (Jan. 2007), 370–7.

Menendez, S. et al. 2010. p53: guardian of reprogramming. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 9, 19 (Oct. 2010), 3887–91.

Mikkelsen, T.S. et al. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 448, 7153 (Aug. 2007), 553–60.

Mikkelsen, T.S. et al. 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 454, 7200 (Jul. 2008), 49–55.

Miller, L.D. et al. 2005. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 38 (Sep. 2005), 13550–5.

Miyagi, S. et al. 2004. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Molecular and cellular biology*. 24, 10 (May 2004), 4207–20.

Mizuno, H. et al. 2010. Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 52 (Dec. 2010), 22745–50.

Molofsky, A. V et al. 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 443, 7110 (Sep. 2006), 448–52.

Moore, S.J. et al. 2016. EcoFlex: A Multifunctional MoClo Kit for E. coli Synthetic Biology. *ACS synthetic biology*. 5, 10 (Oct. 2016), 1059–1069.

Morey, L. et al. 2013. RYBP and Cbx7 define specific biological functions of polycomb complexes in mouse embryonic stem cells. *Cell reports*. 3, 1 (Jan. 2013), 60–9.

Morey, L. et al. 2015. Pluripotency and Epigenetic Factors in Mouse Embryonic Stem Cell Fate Regulation. *Molecular and cellular biology*. 35, 16 (Aug. 2015), 2716–28.

Mu, P. et al. 2017. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53 - and RB1 -deficient prostate cancer. *Science*. 355, 6320 (Jan. 2017), 84–88.

Nakagawa, M. et al. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*. 26, 1 (Jan. 2008), 101–6.

Nakayama, K. et al. 1996. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 85, 5 (May 1996), 707–20.

Naviaux, R.K. et al. 1996. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of virology*. 70, 8 (Aug. 1996), 5701–5.

Nishimura, E.K. et al. 2005. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science (New York, N.Y.)*. 307, 5710 (Mar. 2005), 720–4.

Nishino, J. et al. 2008. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell*. 135, 2 (Oct. 2008), 227–39.

O'Donoghue, K. and Fisk, N.M. 2004. Fetal stem cells. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 18, 6 (Dec. 2004), 853–75.

Oh, J. et al. 2014. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature medicine*. 20, 8 (Aug. 2014), 870–80.

Okubo, T. et al. 2009. Cell lineage mapping of taste bud cells and keratinocytes in the mouse tongue and soft palate. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 27, 2 (Feb. 2009), 442–50.

Okumura-Nakanishi, S. et al. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*. 280, 7 (Feb. 2005), 5307–17.

Olivier, M. and Taniere, P. 2011. Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes. *Current opinion in oncology*. 23, 1 (Jan. 2011), 88–92.

Olivos, D.J. and Mayo, L.D. 2016. Emerging Non-Canonical Functions and Regulation by p53: p53 and Stemness. *International journal of molecular sciences*. 17, 12 (Nov. 2016).

Olovnikov, I.A. et al. 2009. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Seminars in cancer biology*. 19, 1 (Feb. 2009), 32–41.

BIBLIOGRAFÍA

Ortells, M.C. and Keyes, W.M. 2014. New insights into skin stem cell aging and cancer. *Biochemical Society transactions*. 42, 3 (Jun. 2014), 663–9.

Otsubo, T. et al. 2008. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *British journal of cancer*. 98, 4 (Feb. 2008), 824–31.

Park, E.K. et al. 2015. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death and Disease*. 6, 11 (Nov. 2015), e1964.

Park, I.-H. et al. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 451, 7175 (Jan. 2008), 141–6.

Parrinello, S. et al. 2010. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell*. 143, 1 (Oct. 2010), 145–55.

Pevny, L.H. and Lovell-Badge, R. 1997. Sox genes find their feet. *Current opinion in genetics & development*. 7, 3 (Jun. 1997), 338–44.

Piva, M. et al. 2014. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Molecular Medicine*. 6, 1 (Jan. 2014), 66–79.

Pontén, J. and Macintyre, E.H. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 74, 4 (Jan. 1968), 465–86.

Que, J. et al. 2009. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development (Cambridge, England)*. 136, 11 (Jun. 2009), 1899–907.

Rajawat, Y.S. et al. 2009. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing research reviews*. 8, 3 (Jul. 2009), 199–213.

Rando, T.A. 2006. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*. 441, 7097 (Jun. 2006), 1080–6.

Reményi, A. et al. 2003. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes & development*. 17, 16 (Aug. 2003), 2048–59.

Renault, V.M. et al. 2009. FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell*. 5, 5 (Nov. 2009), 527–39.

Reya, T. et al. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414, 6859 (Nov. 2001), 105–11.

Rezza, A. et al. 2014. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Current topics in developmental biology*. 107, (Jan. 2014), 333–72.

Rittié, L. et al. 2009. Hedgehog signaling maintains hair follicle stem cell phenotype in young and aged human skin. *Aging cell*. 8, 6 (Dec. 2009), 738–51.

Rivlin, N. et al. 2011. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & cancer*. 2, 4 (Apr. 2011), 466–74.

- Rodier, F. et al. 2007. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic acids research*. 35, 22 (2007), 7475–84.
- Rodriguez, M.S. et al. 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *The EMBO journal*. 18, 22 (Nov. 1999), 6455–61.
- Rodriguez-Pinilla, S.M. et al. 2007. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 20, 4 (Apr. 2007), 474–81.
- Romero-Lanman, E.E. et al. 2012. Id1 maintains embryonic stem cell self-renewal by up-regulation of Nanog and repression of Brachyury expression. *Stem cells and development*. 21, 3 (Feb. 2012), 384–93.
- Romito, A. and Cobellis, G. 2016. Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem cells international*. 2016, (Jan. 2016), 9451492.
- Rony, I.K. et al. 2015. Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell proliferation*. 48, 2 (Apr. 2015), 140–56.
- Rossi, D.J. et al. 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 447, 7145 (Jun. 2007), 725–9.
- Rudin, C.M. et al. 2012. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature genetics*. 44, 10 (Oct. 2012), 1111–6.
- Rumman, M. et al. 2015. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 33, 10 (Oct. 2015), 2903–12.
- Ryan, K.M. et al. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current opinion in cell biology*. 13, 3 (Jun. 2001), 332–7.
- Sage, J. 2012. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes & development*. 26, 13 (Jul. 2012), 1409–20.
- Sahin, E. and Depinho, R.A. 2010. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*. 464, 7288 (Mar. 2010), 520–8.
- Samavarchi-Tehrani, P. et al. 2010. Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 7, 1 (Jul. 2010), 64–77.
- Sarkar, A. and Hochedlinger, K. 2013. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*. 12, 1 (Jan. 2013), 15–30.
- Schultz, M.B. and Sinclair, D.A. 2016. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development (Cambridge, England)*. 143, 1 (Jan. 2016), 3–14.

BIBLIOGRAFÍA

Sekido, R. and Lovell-Badge, R. 2013. Genetic control of testis development. Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation. 7, 1-3 (Jan. 2013), 21-32.

Sena-Esteves, M. et al. 2004. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. Journal of virological methods. 122, 2 (Dec. 2004), 131-9.

Seoane, M. et al. 2008. Retinoblastoma Loss Modulates DNA Damage Response Favoring Tumor Progression. PLoS ONE. 3, 11 (Nov. 2008), e3632.

Sharpless, N.E. and DePinho, R.A. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. Nature reviews. Molecular cell biology. 8, 9 (Sep. 2007), 703-13.

Shats, I. et al. 2011. Using a stem cell-based signature to guide therapeutic selection in cancer. Cancer research. 71, 5 (Mar. 2011), 1772-80.

Sheaff, R. et al. 1991. Mechanism of DNA polymerase .alpha. inhibition by aphidicolin. Biochemistry. 30, 35 (Sep. 1991), 8590-8597.

Siminovitch, L. et al. 1964. Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. Journal of Cellular and Comparative Physiology. 64, 1 (Aug. 1964), 23-31.

Simons, B.D. and Clevers, H. 2011. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. Cell. 145, 6 (Jun. 2011), 851-62.

Sinclair, A.H. et al. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 346, 6281 (Jul. 1990), 240-4.

Singh, A. and Settleman, J. 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene. 29, 34 (Aug. 2010), 4741-51.

Smith, A.G. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annual review of cell and developmental biology. 17, (Jan. 2001), 435-62.

Smith, A.G. et al. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature. 336, 6200 (Dec. 1988), 688-90.

Song, H. et al. 2007. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. Nature cell biology. 9, 5 (May 2007), 573-80.

Soule, H.D. et al. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 51, 5 (Nov. 1973), 1409-16.

Stadtfeld, M. et al. 2008. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. Cell stem cell. 2, 3 (Mar. 2008), 230-40.

Stadtfeld, M. et al. 2010. A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. Nature methods. 7, 1 (Jan. 2010), 53-5.

Stevanovic, M. et al. 1994. The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 5, 10 (Oct. 1994), 640–2.

Stingl, J. and Caldas, C. 2007. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature reviews. Cancer*. 7, 10 (Oct. 2007), 791–9.

Stolzenburg, S. et al. 2012. Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. *Nucleic acids research*. 40, 14 (Aug. 2012), 6725–40.

Sudo, K. et al. 2000. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 192, 9 (Nov. 2000), 1273–80.

Sugihara, E. and Saya, H. 2013. Complexity of cancer stem cells. *International journal of cancer*. 132, 6 (Mar. 2013), 1249–59.

Sun, C. et al. 2013. Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 30, 2 (Jun. 2013), 503.

Suvà, M.L. et al. 2013. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science (New York, N.Y.)*. 339, 6127 (Mar. 2013), 1567–70.

Suzuki, N. and Withers, H.R. 1978. Exponential decrease during aging and random lifetime of mouse spermatogonial stem cells. *Science (New York, N.Y.)*. 202, 4373 (Dec. 1978), 1214–5.

Tada, M. et al. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current biology : CB*. 11, 19 (Oct. 2001), 1553–8.

Taipale, J. and Beachy, P.A. 2001. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 411, 6835 (May 2001), 349–354.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126, 4 (Aug. 2006), 663–76.

Takahashi, K. et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 5 (Nov. 2007), 861–72.

Taranova, O. V et al. 2006. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes & development*. 20, 9 (May 2006), 1187–202.

Taylor-Jones, J.M. et al. 2002. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mechanisms of ageing and development*. 123, 6 (Mar. 2002), 649–61.

Thomson, J.A. et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*. 282, 5391 (Nov. 1998), 1145–7.

Thorn, C.F. et al. 2011. Doxorubicin pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*. 21, 7 (Jul. 2011), 440–446.

BIBLIOGRAFÍA

Till, J.E. and McCulloch, E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*. 14, (Feb. 1961), 213–22.

Tomioka, M. et al. 2002. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic acids research*. 30, 14 (Jul. 2002), 3202–13.

Tomoda, K. et al. 1999. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. 398, 6723 (Mar. 1999), 160–5.

Tschaharganeh, D.F. et al. 2014. p53-Dependent Nestin Regulation Links Tumor Suppression to Cellular Plasticity in Liver Cancer. *Cell*. 158, 3 (Jul. 2014), 579–592.

Tyner, S.D. et al. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 415, 6867 (Jan. 2002), 45–53.

Ura, H. et al. 2011. Eed/Sox2 regulatory loop controls ES cell self-renewal through histone methylation and acetylation. *The EMBO journal*. 30, 11 (Jun. 2011), 2190–204.

Utikal, J. et al. 2009. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 460, 7259 (Aug. 2009), 1145–8.

van der Flier, L.G. and Clevers, H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology*. 71, (Jan. 2009), 241–60.

van Deursen, J.M. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 509, 7501 (May 2014), 439–46.

Van Meir, E.G. et al. 1994. Analysis of the p53 Gene and Its Expression in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res*. 54, 3 (Feb. 1994), 649–652.

Vandel, L. et al. 2001. Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Molecular and cellular biology*. 21, 19 (Oct. 2001), 6484–94.

Vega, S. et al. 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development*. 18, 10 (May 2004), 1131–43.

Vidal, A. 2007. Of mice without pockets: mouse models to study the function of Rb family proteins. *Frontiers in Bioscience*. 12, 8–12 (May 2007), 4483.

Visvader, J.E. and Clevers, H. 2016. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nature Cell Biology*. 18, 4 (Mar. 2016), 349–55.

Vousden, K.H. and Prives, C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 137, 3 (May 2009), 413–31.

Wabik, A. and Jones, P.H. 2015. Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells. *The EMBO journal*. 34, 9 (May 2015), 1164–79.

Wagers, A.J. and Weissman, I.L. 2004. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. 116, 5 (Mar. 2004), 639–648.

- Walter, V. et al. 2013. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. *PloS one*. 8, 2 (Jan. 2013), e56823.
- Wang, J. et al. 2016. Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. *Genes & Diseases*. 3, 1 (Mar. 2016), 3–6.
- Wang, T.J. et al. 2001. Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. *Biochemical and biophysical research communications*. 287, 1 (Sep. 2001), 173–80.
- Wasielowski, M. et al. 2006. Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*. 99, 1 (Sep. 2006), 97–101.
- Waterstrat, A. and Van Zant, G. 2009. Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Current opinion in immunology*. 21, 4 (Aug. 2009), 408–13.
- Weina, K. and Utikal, J. 2014. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and translational medicine*. 3, (Jan. 2014), 19.
- Weissman, I.L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100, 1 (Jan. 2000), 157–68.
- Weissman, I.L. et al. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology*. 17, (Jan. 2001), 387–403.
- Wernig, M. et al. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448, 7151 (Jul. 2007), 318–24.
- Wigler, M. et al. 1979. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyl-transferase locus into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76, 3 (Mar. 1979), 1373–6.
- Williams, R.L. et al. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 336, 6200 (Dec. 1988), 684–7.
- Williamson, K.A. et al. 2006. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Human molecular genetics*. 15, 9 (May 2006), 1413–22.
- Wilmut, I. et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385, 6619 (Feb. 1997), 810–3.
- Wong, D.J. et al. 2008. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell*. 2, 4 (Apr. 2008), 333–44.
- Wong, K.-K. et al. 2003. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*. 421, 6923 (Feb. 2003), 643–8.
- Yang, A. et al. 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends in genetics : TIG*. 18, 2 (Feb. 2002), 90–5.

BIBLIOGRAFÍA

Yang, J. and Weinberg, R.A. 2008. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*. 14, 6 (Jun. 2008), 818–829.

Yang, N. et al. 2014. Overexpression of SOX2 promotes migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in laryngeal cancer Hep-2 cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 35, 8 (Aug. 2014), 7965–73.

Yang, N. et al. 2014. Overexpression of SOX2 promotes migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in laryngeal cancer Hep-2 cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 35, 8 (Aug. 2014), 7965–73.

Ye, S. et al. 2013. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *The EMBO journal*. 32, 19 (Oct. 2013), 2548–60.

Yeo, J.-C. et al. 2014. Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell stem cell*. 14, 6 (Jun. 2014), 864–72.

Ying, Q.-L. et al. 2003. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell*. 115, 3 (Oct. 2003), 281–292.

Ying, Q.-L. et al. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 453, 7194 (May 2008), 519–23.

Young, R.A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*. 144, 6 (Mar. 2011), 940–54.

Yu, J. and Thomson, J.A. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes & development*. 22, 15 (Aug. 2008), 1987–97.

Yu, J. et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*. 318, 5858 (Dec. 2007), 1917–20.

Zhang, M. et al. 2008. Identification of Tumor-Initiating Cells in a p53-Null Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Research*. 68, 12 (Jun. 2008), 4674–4682.

Zhang, S. and Cui, W. 2014. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells*. 6, 3 (Jul. 2014), 305–11.

Zhang, X. et al. 2013. Pluripotent stem cell protein Sox2 confers sensitivity to LSD1 inhibition in cancer cells. *Cell reports*. 5, 2 (Oct. 2013), 445–57.

Zhao, X. et al. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 461, 7260 (Sep. 2009), 86–90.

Zhou, H.Y. et al. 2014. A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential. *Genes & development*. 28, 24 (Dec. 2014), 2699–711.

Zhou, Z. et al. 2010. Tendon-derived stem/progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate. *Aging cell*. 9, 5 (Oct. 2010), 911–5.